

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Dto. Anatomía, Histología y Neurociencia



TESIS DOCTORAL

**Efecto del VP2.51, inhibidor de la GSK-3, en la
neurogénesis hipocampal adulta y sobre las conductas
relacionadas con la función hipocampal.**

Paloma Pérez-Domper Campos

Instituto Cajal, CSIC

Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo

Madrid, 2014

Memoria presentada por **PALOMA PÉREZ-DOMPER CAMPOS** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID EN EL PROGRAMA DE DOCTORADO DE NEUROCIENCIAS.

JOSÉ LUIS TREJO PÉREZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del CSIC,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada “Efecto del VP2.51, inhibidor de la GSK-3, en la neurogénesis hipocampal adulta y sobre las conductas relacionadas con la función hipocampal”,

De la que es autora **PALOMA PÉREZ-DOMPER CAMPOS**, Licenciada en Bioquímica y con el máster oficial en Neurociencia y Biología del Comportamiento, y que ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto Cajal del CSIC, Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid, el día 10 de marzo de 2014.

Fdo.: José Luis Trejo Pérez

Instituto Cajal, CSIC

Madrid

A mi monguito

"Yo no soy filósofo ni científico. No creo que haya un principio del mal ni del bien. Lo único que sé es que todo está dentro de nuestro cerebro."

José Saramago

Llegados a este momento, es un placer poder dedicar un par de frases a todas aquellas personas que me han apoyado durante esta etapa, tanto personalmente, como laboralmente.

Un primer lugar me gustaría agradecer a José Luis haber confiado en mí y haber sido mi director de tesis. Durante estos tres años hemos formado un equipo cojonudo! Se hace realmente difícil decir en un par de frases lo que ha significado para mí trabajar contigo estos tres-cuatro últimos años. Me has enseñado tantas y tantas cosas. Todo lo que soy hoy es en gran parte gracias a ti. Me has enseñado a hacer experimentos, a trabajar bien, a distribuirme el tiempo, a pensar en lo que hacía etc. El MB03T tiene esa forma de trabajar tan especial, de verdad creo que estás creando tu propia escuela, entramos al lab de una manera u otra manera, pero todos salimos más eficientes y mejores científicos, como siempre dices.."*Festina lente*". También has sabido pararme los pies cuando me he crecido y apoyarme en momentos más bajos, y esto me ha hecho mejor y más fuerte. Gracias por haber sido durante estos años, mi jefe, mi compañero, mi maestro y amigo. GRACIAS.

A mi pequeña coliflor, a mi amiga, a mi compañera, a mi ayudante, a mi aprendiz, a mi profesora, a mi "hermana" como dice José Luis, a la persona con la que más tiempo he pasado estos tres últimos años...a mi SIMOOO!! Sabes lo importante que has sido para mí estos últimos años, que te quiero un montón y que como he dicho antes...somos un equipo cojonudo... una pequeña gran familia José Luis, tú y yo!

También quiero agradecer a nuestras nuevas incorporaciones/fichajes: Gaby, Isa, Tristan y Ángela. Porque habéis traído un soplo de aire nuevo al laboratorio, porque el trabajo es mucho más agradable cuando hay gente que se interesa por aprender y pone entusiasmo. Isa tienes una empatía que se sale fuera de lo normal, gracias por saber escuchar, tener siempre una palabra linda (como dices tú) o un abrazo. Gaby... que te puedo decir! Que eres un tío que PIENSA, no aceptas las cosas porque sí...y eso se agradece. Me lo he pasado d.p.m. trabajando contigo, sigue así, y llegarás muy lejos.

A Silvia, que aunque técnicamente no es de nuestro grupo...es como si lo fuera!!Has sido un fichaje clave para el MB03!!;o)

A los Cajalinos! Porque el Cajal es algo más que un centro de investigación, es un centro social donde conviven el trabajo y las relaciones personales. Gracias a los chic@s del laboratorio de Charo: Irene, Patri, Oscar, Sara, Isa, Chema, Noe, Lula y Ramiro, por ser tan majos y aguantarme todas mis chorradas. Al grupo de Nacho: Andrea, Laura, Ana, Carol, Ángel y Lola, por prestarme material, por aconsejarme científicamente, por estar al tanto de cómo voy, por preocuparos por mí. Quisiera agradecer con especial cariño a Lola TODO lo que ha hecho por mí, tanto científicamente como personalmente. Estos años no hubieran sido iguales si no hubieras estado ahí. Gracias. A las niñas del lab de Vicario: A las Evas, a Vanesa y Çağla porque sois simplemente encantadoras y porque es un placer cruzarme con vosotras por el pasillo, y luego, de manera más o menos espontánea, salir a tomar algo. A los chicos de Liset: a Manu, Edu etc. Porque no hay nada mejor que salir a tomar algo al bar Txus, pelearnos por las tapas y terminar a la 2 de la mañana!;o). También quiero agradecer a Andrea y a Raquel por nuestras incontables horas en quirófano, si es qué trabajar así da gusto! A Julián, porque eres más majo que las pesetas! Da gusto cruzarse contigo! A Sergio, por ser una fuente de lógica, racionalidad, trabajo bien hecho y sobre todo por ser un auténtico amor. Con gente como tú la ciencia española tiene un futuro inimaginable! Y a todos los demás, que por una cosa u otra conseguís que el día en el Cajal se pase volando!

A todo el personal de los servicios, porque conseguís que nuestro trabajo salga adelante. A Carmen, Belén y Jose (que aunque ya no esté, hemos pasado muuuuchas horas en confocal juntos) porque quien iba a decir que el tiempo se iba a pasar tan rápido en una sala en la que hace un frío que pela, con poca luz y con 2 pantallas gigantes y brillantes!! Y en especial a Carmen...you know!gracias! A Silvia de SBMC, por resolverme tantas y tantas dudas con una sonrisa en la cara, gracias. A Ainhoa, porque hacer conducta contigo respaldándome es un auténtico placer, de verdad gracias por tu ayuda. Al servicio de animalario y en especial a Laude, por ayudarme cuando faltaba espacio o proponía un experimento que casi sobrepasaba la capacidad del animalario. Gracias por la ayuda y apoyo, de corazón.

También quisiera agradecer a Nacho Torres el haberme financiado dos años. A Charo Moratalla por siempre tener una sonrisa por el pasillo, por conseguirme las hojas de protocolo de Biomedicas y por preguntarme sus dudas tecnológicas...nunca olvidaré el momento "hablo con Siri" creo que han sido de las veces que más nos hemos reído, gracias por alegrarnos esa tarde!;o). Y quisiera agradecer también todo lo que ha hecho por mí a María de Ceballos, tú y yo sabemos que tengo una gran deuda contigo y espero poder compensarte.

Finalmente quisiera agradecer y valorar el trabajo que hacen tanto Javi como Aurelio en el Cajal. Estáis pendientes de todo y siempre con una sonrisa. Es un placer veros cuando voy a salir del Cajal y enredarnos a hablar media hora!

También me gustaría agradecer a Ana Guadaño que me iniciara en el mundo de la neurogénesis hipocampal adulta y me recomendara a José Luis. A todo su grupo, donde hice la Avanzada de Bioquímica, a Iván, Dani y Anita, por enseñarme las técnicas del labo y por lo bien que nos lo pasábamos! También a los chicos de Ricardo, Javi y Sergio. En especial a Javi, porque es un coco y porque trabaja mucho y muy bien! Me encanta seguir teniendo contacto contigo y espero en un futuro que podamos hacer algún trabajo juntos.

A mis niñitas, a Clara, Carol y Lidia... porque cada una aporta lo necesario para que juntas seamos mejores. Clarita, por entenderme, en todos los aspectos de la vida, en esta fase tan difícil. A Carol, por enseñarme a ser fuerte y que nosotras podemos con todo lo que nos echen! A Lidia, porque eres mi otro yo, porque sin ti en muchas ocasiones me ahogaría, eres mi salvavidas! GRACIAS!

A Tamara y Ann, porque aunque ahora estemos lejos habéis sido siempre un gran apoyo y fuente de distracción...por qué nos vamos a engañar!!jajajaja. Gracias

A mi Tere, porque aunque estés lejos te adoro y no sabes la ganitas que tengo de verte! A Liber por escucharme y ayudarme siempre, gracias. A Nata, porque eres la mejor persona que conozco y ojalá el mundo aprendiera un poquito de ti. A Jesús, por ser como eres, por ser mi amigo. De nuevo otra persona ejemplar.

A mis chicos de Toledo! A Cris y a Finn! Cris, aunque siempre digo que el 2013 ha sido mal año, tú has sido lo mejor de él. Gracias por entrar en mi vida y espero que nunca salgas. A Finn por nuestras conversaciones cuando voy a veros a la guardia o en tu/mi casa. Es fácil quedar contigo, no hace falta más que un vaso de agua, sentarnos a hablar y desconectar.

A la secta del máter!!Porque me encanta que nos llamen la secta...porque estamos muy unidos sentimentalmente y espero que en un futuro próximo también lo estemos laboralmente...manejaremos la neurociencia en España (uajajaja...risa maligna). A mi Palo, Afri, Rafa infor, Dr. War, Luci, Clara, Fran Murcia, Fran Canadá, Fran C, Lari, Marce, Luchito, Ate etc. También a los

agregados, David P, David E y Dani. Entre todos habéis sido la bocanada de oxígeno necesaria para empezar y terminar la tesis con ganas y fuerza!

A mi familia, que ahora está dividida en dos. Una vive aquí en España y es familia-familia y otra que vive en Perú, que la conozco desde hace menos pero en términos sentimentales también son mi familia.

A mis padres, por aguantarme todos mis melodramas...porque aunque la tesis requiere esfuerzo, al final es un placer decir que has hecho el trabajo lo mejor que has sabido y que has aprendido mucho. Gracias por apoyarme durante este periodo. A mi hermano Nico que te quiero un montón pequeño! Y a mi hermana Cris, porque hemos vivido muchas cosas juntas y nos han hecho estar más unidas que nunca. Os quiero mucho familia.

A mis abuelos de Palma, por el tipo de vida que lleváis y los valores que tenéis. Ojala más parejas fueran tan felices como lo sois vosotros. A mi abuela y madrina, porque eres una luchadora. Porque eres quien eres gracias a la decisiones que has tomado a lo largo de tu vida. De ti he aprendido: a nadar, a navegar, a hablar inglés, la pasión por la equitación, a tomar el té inglés y tantas y tantas cosas! Hemos pasado juntas los momentos más importantes de mi vida. Gracias por estar siempre ahí, ahora me toca estar a mi ;o). A mi tía María por cuidar tanto de todos y siempre preocuparse por nosotros. Gracias

A la familia del otro lado del charco, por apoyarme siempre, por interesarse por mi trabajo, por escucharme y estar sentimentalmente ahí. Este año me pierdo el bautizo de Emilia y el matri de Gonza y Clau para preparar la presentación de la tesis, gracias por entenderlo y saber que ahora lo importante es mi futuro. "Primero la obligación y luego la diversión" :)

Y Finalmente quería dar las gracias a Alan, mi monguito! Por ayudarme en esta tesis con la parte médica, por conseguirme todos los papers que le he pedido, por aguantar mis días buenos y mis días malos, por apoyarme, por entenderme, por quererme como me quieres, porque sin ti este trabajo no habría sido posible. Gracias por compartir todo conmigo, somos un equipo, y por tanto parte de esta tesis es tuya. Gracias.

Indice

I. Abreviaturas.....	1
II. Introducción.....	5
1. La proteína glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3).....	6
1.1 Isoformas de la GSK-3.....	6
1.2 Regulación de la GSK-3.....	7
1.2.1 Regulación por prefosforilación del sustrato.....	8
1.2.2 Control de la actividad de la GSK-3 por fosforilación.....	8
1.2.3 Regulación por asociación con otras proteínas.....	9
1.2.4 Regulación por localización subcelular.....	9
1.3 Vías de señalización que regulan la actividad de la GSK-3.....	9
1.3.1 Rutas de señalización que inhiben la GSK-3.....	9
1.3.1.1 Inhibición por la fosforilación de la serina 21/9.....	9
1.3.1.2 Inhibición de la GSK-3 por la vía canónica de Wnt.....	10
1.3.2 Vías que activan la actividad de la GSK-3.....	11
1.4 Sustratos de la GSK-3.....	12
1.5 Implicaciones de la GSK-3 en la depresión.....	13
1.6 Inhibidores de la GSK-3.....	19
2. Neurogénesis adulta.....	21
2.1. Connotaciones históricas y conceptos generales.....	21
2.2 Regiones neurogénicas y no neurogénicas del cerebro.....	22
2.3 Neurogenesis hipocampal adulta (AHN).....	24
2.3.1 Estructura de la formación hipocampal y sus funciones.....	24
2.3.2 La zona subgranular del giro dentado.....	26
2.4 Regulación de la AHN.....	29
2.4.1 Regulación de la AHN por Wnt.....	29
2.4.1 Regulación de la AHN por estrés.....	30

2.5 Funciones de la neurogénesis hipocampal adulta.....	32
2.5.1 Implicación funcional de la AHN en el aprendizaje y la memoria.....	32
2.5.2 Implicación funcional de la AHN en depresión.....	33
3. La depresión.....	37
3.1 Aspectos generales.....	37
3.2 Etiología de la depresión.....	39
3.3 Neurobiología de la depresión.....	40
3.3.1 Neurotransmisores.....	40
3.3.1.1 Alteraciones en el sistema serotoninérgico.....	40
3.3.1.2 Alteraciones en el sistema noradrenergico.....	40
3.3.1.3 Alteraciones en el sistema dopaminérgico.....	41
3.3.1.4 Alteraciones en GABA y glutamato.....	41
3.3.2 Estrés y depresión, hipótesis de la cascada de glucocorticoides.....	42
3.3.3 Hipótesis neurogénica de la depresión.....	42
3.4 Tratamientos antidepresivos.....	43
4. Sumario de los antecedentes.....	44
III. Objetivos.....	47
III. Material y métodos.....	49
1. Animales de experimentación.....	50
1.1 Tratamientos crónicos farmacológicos.....	50
1.2 Tratamiento agudo con el inhibidor de GSK3 VP2.51.....	54
1.3 Análogos de timidina.....	54
1.3.1 Estudios de proliferación.....	54
1.3.2 Estudios de la recuperación proliferativa/supervivencia tras una prueba de natación forzada (Porsolt).....	55
1.4 Sacrificio y obtención del tejido.....	56
2. Estudios de comportamiento y memoria.....	57

2.1 Prueba del Laberinto en Cruz (EPM, del inglés Elevated Plus Maze).....	57
2.1.1 Desarrollo de la prueba.....	58
2.1.2 Evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad.....	58
2.2 Prueba de la natación forzada (FST, del inglés Forced Swimming Test).....	59
2.2.1 Desarrollo de la prueba.....	59
2.2.2 Evaluación del efecto antidepresivo del fármaco con el FST.....	60
2.3 Prueba de suspensión por la cola (TST del inglés Tail Suspension Test).....	60
2.3.1 Desarrollo de la prueba.....	61
2.3.2 Evaluación del efecto antidepresivo del fármaco con el TST.....	61
2.4 Prueba de anidamiento.....	61
2.4.1 Desarrollo de la prueba.....	61
2.4.2 Evaluación de la capacidad de anidamiento.....	61
2.5 La jaula de actividad.....	62
2.5.1 Desarrollo de la prueba.....	62
2.5.2 Evaluación de la actividad motora.....	62
2.6 Prueba del laberinto acuático (MWM; del inglés Morris Water Maze).....	65
2.6.1 MWM de un día (objetivo 2).....	66
2.6.1.1 Desarrollo de la prueba.....	66
2.6.1.2 Evaluación del aprendizaje espacial.....	66
2.6.2 MWM clásico con evaluación del aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo.....	68
2.6.2.1 Desarrollo de la prueba.....	68
2.6.2.2 Evaluación del aprendizaje espacial, la memoria a largo plazo y la reactivación.....	68
2.7 Reconocimiento de un objeto nuevo (NOR, del inglés Novel Object Recognition).....	69
2.7.1 Desarrollo de la prueba.....	69
2.7.2 Evaluación de la memoria a largo plazo.....	70

2.8 Prueba de aprendizaje de evitación pasiva (PA, del inglés Passive Avoidance)...	71
2.8.1 Desarrollo de la prueba.....	72
2.8.2 Evaluación de la memoria a largo plazo.....	72
3. Modelo de depresión mayor (MDD, del inglés Major Depressive Disorder) mediante un estrés suave crónico e impredecible (UCMS, del inglés Unpredictable Chronic Mild Stress).....	73
4. Análisis bioquímicos (Western Blot).....	76
4.1 Obtención de la muestra y cuantificación de proteína.....	76
4.2 Electroforesis y transferencia.....	77
4.3 Inmunodetección de las proteínas.....	77
5. Inmunohistoquímica (fluorescencia).....	78
5.1 Obtención de las secciones de tejido.....	78
5.2 Desarrollo de la inmunohistoquímica.....	78
6. Tinción histológica con la técnica Nissl.....	80
7. Determinación del volumen hipocampal, volumen del giro dentado y área de la SGZ mediante el método de Cavalieri.....	81
7.1 Cuantificación del volumen del giro de la formación hipocampal.....	83
7.2 Cuantificación del volumen del giro dentado del hipocampo.....	84
7.3 Cuantificación del área de SGZ.....	84
8. Análisis estereológico de las poblaciones neuronales.....	84
8.1 Método del Fraccionador.....	85
8.2 Método del Disector físico en U.....	86
8.2.1 Obtención de los disectores.....	86
8.2.2 Cuantificación del número de células por unidad de área de SGZ.....	86
8.2.3 Cuantificación del número total de células en la SGZ de la formación hipocampal.....	86
8.3 Método del Disector físico direccionado.....	87
9. Análisis estadístico.....	87

IV. Resultados.....	89
A. Estudios previos con el VP2.51: Diseño, síntesis y estudios in vitro.....	91
1. El diseño, síntesis y evaluación enzimática del VP2.51.....	92
1.1 Diseño del VP2.51.....	92
1.2 Síntesis del VP2.51.....	93
1.3 Evaluación enzimática.....	94
2. Estudios in vitro: efectos del inhibidor VP2.51 en proliferación, migración y diferenciación de células madre neurales.....	96
2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación.....	97
2.2 Efecto del VP2.51 en la migración.....	98
2.3 Efecto del VP2.51 en la diferenciación.....	98
3. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	99
B. Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 1: Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta.....	101
1. Peso corporal y ganancia de peso.....	103
2. Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.....	104
2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación en el giro dentado de la formación hipocampal.....	104
2.2 Efecto del VP2.51 en la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas de novo en el giro dentado de la formación hipocampal.....	106
3. Efecto del VP2.51 en conductas relacionadas con la ansiedad.....	109
C. Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 2: Efecto crónico del fármaco en conductas relacionadas con la función hipocampal. Validez predictiva.....	111
1. Efecto del VP2.51 en el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo.....	113
2. Efecto del VP2.51 en la desesperanza aprendida.	115
2.1 ¿Es un antidepresivo potencial? Test de validez predictiva.....	115
2.2 Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.....	116
2.2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación/supervivencia de la SGZ del Giro Dentado.....	117

2.2.2 Efecto del VP2.51 en la supervivencia de las poblaciones inmaduras....	118
2.2.3 ¿Existe un correlato histológico-conductual en el efecto antidepresivo del VP2.51?.....	119
D. Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 3: Efecto terapéutico del VP2.51 en la conducta depresiva.....	123
1. Efecto del VP2.51 en la recuperación de la conducta relacionada con ansiedad/depresión.....	125
2. Efecto del VP2.51 en la conducta relacionada con la ansiedad.....	127
3. Efecto del VP2.51 en neurogénesis hipocampal adulta, ¿Existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas?.....	128
3.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación.	128
3.2 Efecto del FST en la proliferación y/o supervivencia de las células generadas 24 horas antes y 48 horas después del FST. ¿Son estas células sensibles al tratamiento con el VP2.51?.....	130
3.3 Efecto del VP2.51 en las subpoblaciones neurogénicas inmaduras.....	132
E. Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 4: Efecto del VP2.51 en un modelo de depresión mayor. Comparativa con la fluoxetina.....	135
1. Parámetros críticos para evaluar la eficiencia del protocolo UCMS y del tratamiento farmacológico.....	138
1.1 Peso corporal y ganancia de peso.....	138
1.2 Estado del pelaje y de la anidación.....	140
1.3 Estudio de la conducta relacionada con la ansiedad antes y después del tratamiento.....	142
2. Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y la fluoxetina en un modelo de MDD.....	143
3. Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocampal, en la capa granular del giro dentado y el área de la SGZ.....	144

4. Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la neurogénesis hipocampal adulta.....	147
4.1 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la proliferación.....	147
4.2 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en las sub-poblaciones inmaduras de la SGZ.....	150
4.3 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en las células granulares del giro dentado.....	153
F. Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 5: Efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados crónicamente con el inhibidor VP2.51.....	157
1. Peso corporal y ganancia en peso.....	159
2. Estudio del efecto del VP2.51 en la actividad normal de un ratón.....	160
3. Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje y memoria a largo plazo.....	162
3.1 Estudio del efecto del VP2.51 en la consolidación y reactivación en una prueba de reconocimiento de objetos (NOR).....	163
3.2 Efecto del VP2.51 en la consolidación y en una prueba de evitación pasiva (PA).....	164
3.3 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo.....	166
G Estudios in vivo del efecto del VP2.51. Objetivo 6: Mecanismo de acción del VP2.51.....	169
V Discusión.....	175
1. Consideraciones técnicas.....	176

1.1 Estimaciones de número total de células.....	176
1.1.1 Estimación del número total con una baja densidad de partículas. El fraccionador.....	177
1.1.2 Estimación del número total con una alta densidad de partículas. El disector.....	178
1.1.2.1 El disector físico.....	179
1.1.2.2 Disector físico en U.....	181
1.1.2.3 Disector físico direccionado.....	184
1.2 Evaluación del efecto antidepresivo del VP2.51.....	184
2. Efecto VP2.51 en el peso corporal y la ganancia en peso.....	190
3. Estudios in vivo del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta y en el comportamiento relacionado con la ansiedad.....	191
3.1 Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.....	191
3.1.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación en el giro dentado de la formación hipocampal.....	192
3.1.2 Efecto del VP2.51 en la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas de novo en el giro dentado de la formación hipocampal.....	195
3.2 Efecto del VP2.51 en el comportamiento relacionado con la ansiedad.....	197
4. Estudios in vivo del VP2.51. Efecto crónico del fármaco sobre conductas relacionadas con la función hipocampal.....	197
4.1 Efecto del VP2.51 en la desesperanza aprendida, ¿es un antidepresivo potencial?.....	197
4.1 Efecto del VP2.51 en el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo.....	198

5. Estudios in vivo del VP2.51. Efecto terapéutico.....	200
5.1 Efecto del VP2.51 en la recuperación de la conducta relacionada con ansiedad/depresión.....	200
5.2 Efecto del VP2.51 en la conducta relacionada con la ansiedad.....	201
5.3 Efecto del VP2.51 sobre la neurogénesis hipocampal adulta, ¿Existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas?.....	202
6. Efecto del VP2.51 en un modelo de depresión mayor. Comparativa con la fluoxetina.....	207
6. 1 Parámetros críticos para evaluar la eficiencia del protocolo UCMS y del tratamiento farmacológico.....	208
6. 2 Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y la fluoxetina en un modelo de MDD.....	213
6. 3 Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocampal.....	215
6. 4 Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la neurogénesis hipocampal adulta.....	216
7. Efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados crónicamente con el inhibidor VP2.51.....	227
7.1 Estudio del efecto del VP2.51 en la actividad normal de un ratón.....	229
7.2 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la memoria a corto plazo, la memoria a largo plazo y la reactivación de la memoria.....	230
7.2.2 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de la memoria a largo plazo.....	231

7.2.1 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje y la memoria a corto plazo.....	233
8. Mecanismos de acción del VP2.51.....	233
VI Conclusiones.....	237
VII Bibliografía.....	241

Lista de abreviaturas

Ach	Del inglés Acetil choline, acetil colina
AHN	Del inglés Adult Hippocampal Neurogénesis, neurogénesis hipocampal adulta
BDNF	Del inglés, brain-derived neurotrophic factor
BHE	Barrera HematoEncefálica
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CA	<i>Cornu Ammonis</i> o Cuerno de Ammon
Calret	Calretinina
CldU	5-cloro-2-desoxiuridina
CTR	Control
DA	Dopamina
DCX	Doblecortina
DEX	Dexametasona
EPM	Del inglés Elevated Plus Maze, Prueba del laberinto en cruz
Fluox	Fluoxetina
FST	Del inglés Forced Swimming Test, prueba de la natación forzada
GCL	Del inglés granular cell layer, capa granular
GC	Glucocorticoides
GD	Giro Dentado
GR	Del inglés Glucocorticoid Receptor, receptor de glucocorticoides
GSK-3	Del inglés Glycogen Synthase Kinase 3, Glucógeno sintasa quinasa 3
HPA	Del inglés Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, hipotálamo-hipofisario-adrenal

IdU	5-yodo-2-desoxiurina
LTD	Del inglés Long Term Depression, depresión a largo plazo
LTP	Del inglés Long Term Potentiation, potenciación a largo plazo
MCL	Del inglés Molecular Cell Layer, capa molecular
MDD	Del inglés Major Depressive Disorder, trastorno depresivo mayor
mPFC	Del inglés medial PreFrontal Cortex, corteza prefrontal medial
MWM	Del inglés Morris Water Maze, prueba del laberinto acuático
NE	Del inglés NorEpinefrine, noradrenalina
NOR	Del inglés Novel Object Recognition, reconocimiento de un objeto nuevo
NSC	Del inglés Neural Stem Cells, células madre neurales
PA	Del inglés Passive Avoidance, evitación pasiva
PFA	Paraformaldehído
PFC	Del inglés PreFrontal Cortex, corteza prefrontal
pGSK-3	Del inglés Phospho GSK-3, GSK-3 fosforilada
pH3	Del inglés Phospho Histone 3, histona 3 fosforilada
Ser	Serina
SGZ	Del inglés SubGranular Zone, zona subgranular
SVZ	Del inglés SubVentricular Zone, zona subventricular
TST	Del inglés Tail Suspension Test, prueba de suspensión por la cola
Tyr	Tirosina
Veh	Vehículo
5-HT	Serotonina

INTRODUCCIÓN

1. La proteína glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3)

La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es una serina-treonina quinasa que inicialmente fue identificada por su papel en el metabolismo celular como responsable en la inactivación mediante fosforilación de la glucógeno sintasa (Embi, Rylatt et al. 1980). Posteriormente se describió que la GSK-3 está involucrada en la regulación de números procesos biológicos. En el sistema nervioso central la GSK-3 modula varios aspectos de la función neural como son la expresión génica, la neurogénesis, la plasticidad sináptica, la estructura neuronal y la muerte y supervivencia neuronal entre otros (Hur and Zhou 2010, Li and Jope 2010, Bradley, Peineau et al. 2012).

En las últimas décadas, la GSK-3 se ha visto implicada en procesos patológicos como en la demencia de tipo Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la depresión mayor, la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Kozlovsky, Belmaker et al. 2002, Hu, Zhang et al. 2003, Hye, Kerr et al. 2005, Karege, Perroud et al. 2007, Lovestone, Killick et al. 2007, Saus, Soria et al. 2010, Forlenza, Torres et al. 2011, Karege, Perroud et al. 2012).

La GSK-3 es una quinasa muy conservada, existiendo homólogos en todos los eucariotas hasta ahora analizados y compartiendo un 90% de homología en el dominio de la quinasa. Su distribución es ubicua, aunque sus niveles de expresión pueden cambiar entre tejidos o tipos celulares, siendo más abundante en el sistema nervioso (Woodgett 1990).

1.1 Isoformas de la GSK-3

Existen dos isoformas en mamíferos la GSK-3 α (51 KkDa) y la GSK-3 β (47 kDa), codificadas por genes distintos ubicados en el cromosoma 19 y 3 respectivamente. Las dos isoformas tienen un 85% de homología en la estructura y un 98% de homología en el dominio quinasa (Woodgett 1990). En roedores y humanos se ha reportado la existencia de una variante de “splicing” de la GSK-3 β , la GSK-3 β 2. Esta variante tiene 13 aminoácidos adicionales en el dominio de la quinasa. La GSK-3 β 2 se expresa específicamente en el sistema nervioso (SN) y sus valores más elevados se encuentran

durante el desarrollo (Mukai, Ishiguro et al. 2002). Aunque existe poca bibliografía sobre la función de la GSK-3 β , se piensa que esta isoforma juega un papel específico en la morfogénesis neuronal *in vitro* (Wood-Kaczmar, Kraus et al. 2009, Castano, Gordon-Weeks et al. 2010).

A pesar de la gran homología entre ambas isoformas, funcionalmente no son idénticas. Aunque diversos trabajos ponen de manifiesto este hecho, el trabajo que puso ésto en evidencia fue la delección de la GSK-3 β , que resultó tener un efecto letal en los embriones de ratón, lo que sugiere que la GSK-3 α es incapaz de compensar la ausencia de la isoforma β (Hoeflich, Luo et al. 2000).

1.2 Regulación de la GSK-3.

A diferencia de otras quinasas, la GSK-3 es constitutivamente activa en condiciones normales y su actividad puede ser regulada por cuatro mecanismos básicos que a continuación detallaremos (figura 1).

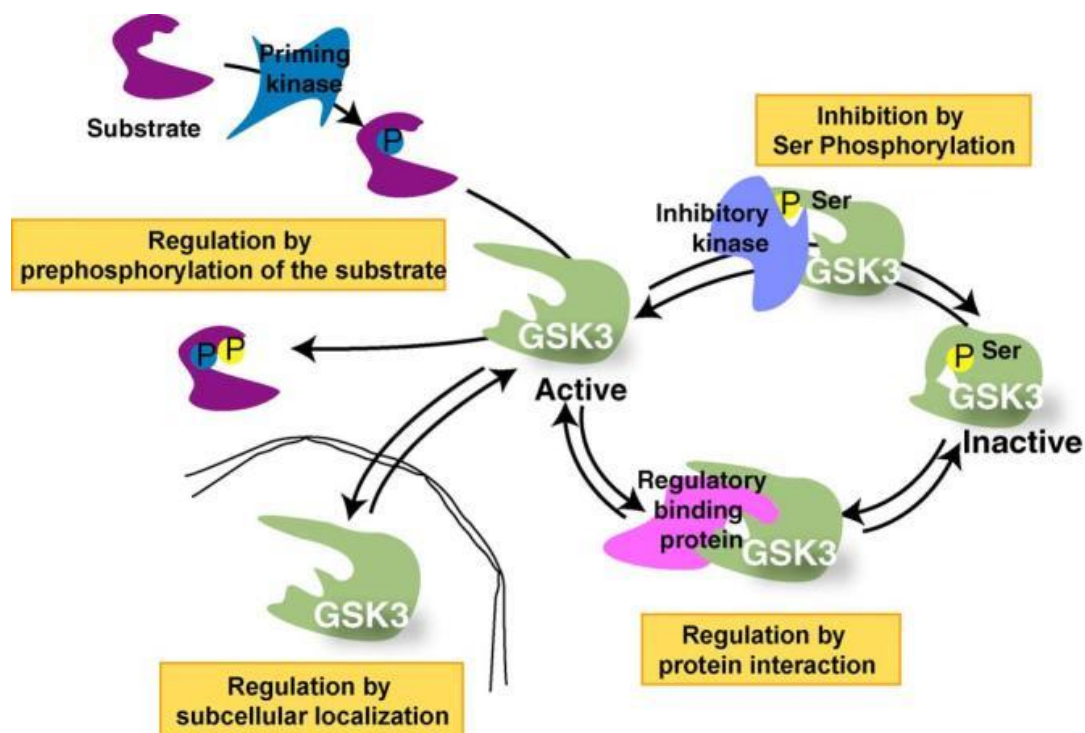


Figura 1: Mecanismos que regulan la GSK-3. (Beurel and Joep 2006).

1.2.1 Regulación por pefosfosforilación del sustrato.

La actividad de la GSK-3 está limitada por la acción de otra quinasa que actúe pefosforilando el sustrato (Picton, Woodgett et al. 1982). Los sustratos que ha recibido un pefosforilación previa se denominan sustratos primados.

1.2.2 Control de la actividad de la GSK-3 por fosforilación

Tanto la GSK-3 α como la GSK-3 β tienen dos residuos, que en función de su estado de fosforilación, determinan su grado de actividad. La fosforilación de la serina 21 y 9 de la GSK-3 α y GSK-3 β respectivamente promueve una inhibición de la quinasa disminuyendo su actividad enzimática (figura 1) (Sutherland, Leighton et al. 1993, Frame, Cohen et al. 2001). Esta reducción de la actividad se produce porque la fosforilación de la serina se comporta como pseudosustrato e impide la unión de un sustrato pefosforilado (Dajani, Fraser et al. 2001). La fosfatasa Laforina parece la encargada de eliminar el fosfato de las serinas regulatorias (Lohi, lanzano et al. 2005).

Existen también otros dos residuos, la tirosina 279 y 216 de la GSK-3 α y GSK-3 β respectivamente, que inducen una activación de la quinasa incrementando su actividad enzimática (figura 2) (Hughes, Nikolakaki et al. 1993).

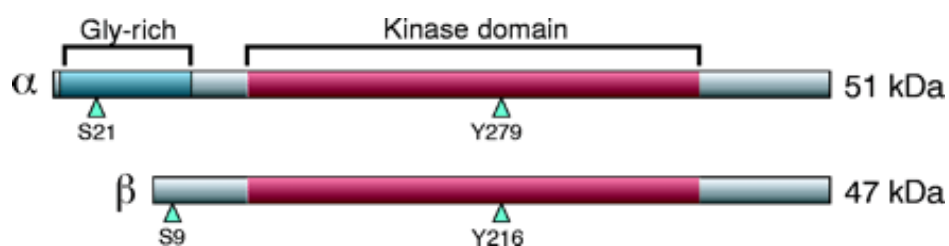


Figura 2: Representación esquemática de la GSK-3 α y la GSK-3 β . Los residuos reguladores por fosforilación se marcan con una cabeza de flecha azul (Doble and Woodgett 2003).

También se han descrito otros residuos con capacidad regulatoria en la GSK-3 β , las treoninas 43 y 390, estas parecen facilitar la posterior fosforilación de la serina 9 y por tanto regulan la inhibición de esta (Ding, Xia et al. 2005, Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008).

1.2.3 Regulación por asociación con otras proteínas.

La GSK-3 puede formar parte de un complejo multiproteico que facilita la actividad enzimática de la quinasa sobre su sustrato. Esto ocurre específicamente en la vía canónica de *Wnt* (Ikeda, Kishida et al. 1998). En el sentido contrario también existen proteínas de unión a la GSK-3, llamadas FRATS o GBPs, que interaccionan con la GSK-3 inhibiendo su función (Li, Yuan et al. 1999).

1.2.4 Regulación por localización subcelular.

Las acciones de la GSK-3 también están reguladas por el control de su localización subcelular. La dinámica regulación entre el núcleo, la mitocondria y otras regiones subcelulares genera un control selectivo de sus acciones en diferentes compartimentos celulares (Jope and Roh 2006).

1.3 Vías de señalización que regulan la actividad de la GSK-3.

Aunque previamente hemos descrito 4 mecanismos de regulación de la GSK-3, los mecanismos regulatorios mejor conocidos son la fosforilación de la quinasa en sus residuos Ser21/9 y Tyr279/216 y la regulación de la actividad de la GSK-3 por la vía canónica de *Wnt*.

1.3.1 Rutas de señalización que inhiben la GSK-3

La regulación de la inhibición de la actividad de la GSK-3 en respuesta a estímulos externos se da por dos vías principalmente, la fosforilación de la Ser 21/9 de la GSK-3 y la vía canónica de *Wnt*.

1.3.1.1 Inhibición por la fosforilación de la serina 21/9.

La inhibición de la GSK-3 responde a estímulos externos que activan diferentes rutas de señalización. Las principales moléculas son los aminoácidos, los factores de crecimiento y la insulina/IGF-1 (del inglés, Insulin like Growth Factor 1) , aunque estas últimas son las principales promotoras de la inhibición de la GSK-3. La unión de estas moléculas a sus receptores induce la activación de diferentes vías de señalización que finalmente involucran la actividad de una quinasa que fosforila la GSK-3. La quinasa principal responsable de fosforilar la GSK-3 es Akt, también llamada PKB (del inglés,

Protein Kinase B) (Cross, Alessi et al. 1995), sin embargo también se han identificado otras quinasas que participan en esta inhibición, como son la PKA, la p70S6K, la ILK, algunas isoformas de la PKC (Goode, Hughes et al. 1992, Delcommenne, Tan et al. 1998, Fang, Yu et al. 2000, Cohen and Frame 2001).

1.3.1.2 Inhibición de la GSK-3 por la vía canónica de *Wnt*.

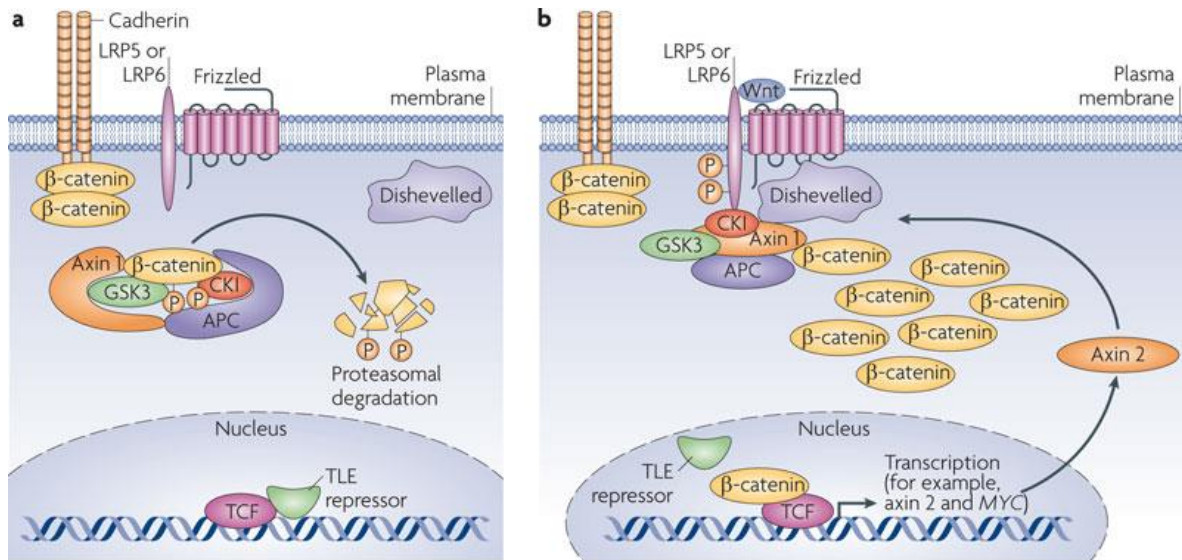
La cascada metabólica en respuesta a las proteínas *Wnt* está muy conservada a lo largo de la evolución. La familia *Wnt* incluye 19 proteínas glicosidadas en mamíferos.

Se han descrito tres vías de señalización de *Wnt*: la vía canónica, la vía no canónica de polaridad celular y la vía no canónica calcificada. Todas las vías se activan por la unión de una proteína de la familia *Wnt* a un receptor de la familia *Frizzled* y al co-receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR5/LPR6), que a su vez inducen la activación de la proteína *Dishevelled* (Dsh). En este punto cada una de las vías genera una respuesta celular diferente. La inhibición de la GSK-3 se induce por la vía canónica (figura 3).

En ausencia de señal, el complejo multiproteico de destrucción APC (del inglés, adenomatous poliposis coli)-axina1-GSK-3-CK1 (del inglés, Casein Kinase 1) está unido y fosforila β -cateninas no asociadas a cadherinas. Tras la fosforilación la p β -catenina es motivo de reconocimiento de la E3-ubiquitina-ligasa, que aumenta su ubiquitinación y consecuentemente su degradación por el proteosoma. En el núcleo TCF está unido a un represor que inactiva la transcripción de determinados genes (Yost, Torres et al. 1996, Aberle, Bauer et al. 1997, Hur and Zhou 2010, McNeill and Woodgett 2010).

En presencia de *Wnt* se induce un cambio conformacional en el receptor *Frizzled* y en el co-receptor LPR5 o LPR6 que inducen la fosforilación del co-receptor. Esta fosforilación genera un sitio de alta afinidad para axina-1 y promueve la disfunción del complejo multiproteico de destrucción, inhibiendo la actividad de la GSK-3. La β -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo donde se asocia con las proteínas nucleares TCF/LEF-1 (familia de factores de transcripción) y disocia el represor TLE y promueve la actividad transcripcional de genes como MYC o la axina2. La axina 2 a su vez genera un efecto de retroalimentación positiva inhibiendo la

formación de complejos de destrucción (Yost, Torres et al. 1996, Hur and Zhou 2010, McNeill and Woodgett 2010).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 3: Vía canónica de Wnt. (A) En ausencia de Wnt la GSK-3 forma parte de un complejo multiproteico de destrucción que induce la degradación de la β-catenina y la represión de la actividad transcripcional de determinados genes. **(B)** En presencia de los ligandos Wnt, el correceptor LRP5 o LRP6 se fosforila generando un sitio de unión para la axina-1 del complejo multiproteico de destrucción. La interacción con el correceptor inhibe la actividad de la GSK-3 entre otras y promueve la acumulación de la β-catenina. Esta se transloca al núcleo donde va a activar la actividad transcripcional de determinados genes. (McNeill and Woodgett 2010).

1.3.2 Vías que activan la actividad de la GSK-3.

Aunque a GSK-3 es constitutivamente activa, la fosforilación de los residuos Tyr 279/216 han demostrado aumentar su actividad. Se han identificado las quinasas Fyn, Csk, y PYK2 entre otras como responsables de inducir esta fosforilación y de promover la actividad de la GSK-3 (Lesort, Jope et al. 1999, Hartigan, Xiong et al. 2001, Fan, Ballou et al. 2003, Sayas, Ariaens et al. 2006). Además se ha propuesto un sistema de autofosforilación (Cole, Frame et al. 2004).

Las rutas de señalización involucradas en incrementar la actividad de la GSK-3, suelen responder en su mayoría a estímulos pro-apoptóticos como la estaurosporina o la exposición a LPA (del inglés, lysophosphatidic acid) entre otros (Bijur and Jope 2001, Sayas, Ariaens et al. 2006, Diaz-Velasquez, Castro-Munozledo et al. 2008, Sun, Kim et al. 2011).

1.4 Sustratos de la GSK-3.

Aunque el nombre de la GSK-3 es debido al primer sustrato que se descubrió, actualmente se han identificado numerosos sustratos de la quinasa. Se ha descrito la implicación de la GSK-3 en la proliferación, migración neuronal, polarización neuronal y crecimiento axónico.

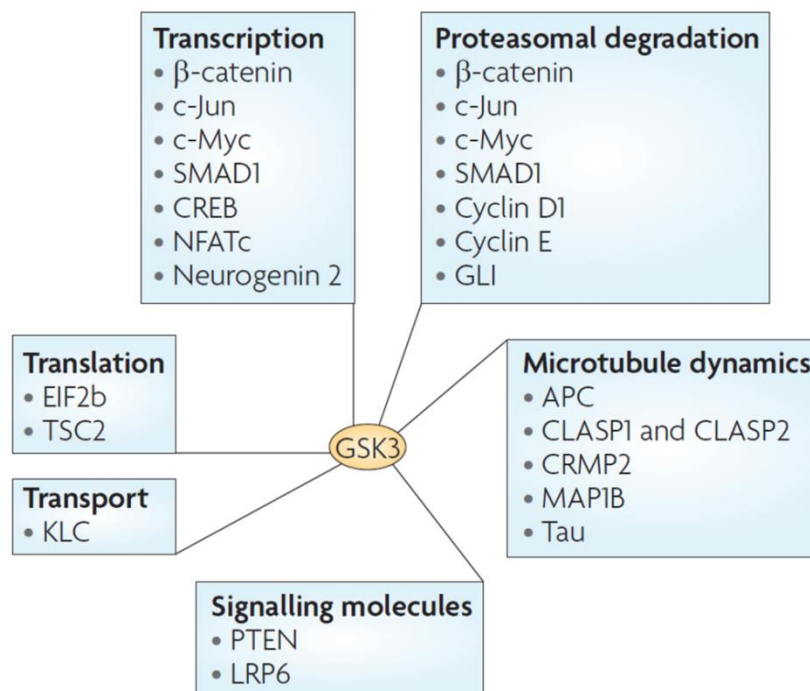


Figura 4: Sustratos fosforilados por la GSK-3 implicados en el desarrollo neural. (Hur and Zhou 2010).

Algunos de los sustratos implicados en estos procesos son factores de transcripción como CREB (del inglés, cAMP response element-binding) (Grimes and Jope 2001), la

neurogenina 2 (Ma, Song et al. 2008), SMAD1 (Fuentealba, Eivers et al. 2007), c-Jun (de Groot, Auwerx et al. 1993) y la β -catenina (Aberle, Bauer et al. 1997). La GSK-3 regula estos factores de transcripción regulando su concentración, interacción con el DNA y localización nuclear. Además de regular la transcripción génica, la GSK-3 regula la actividad de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, del inglés microtubule-associated proteins) que están implicadas en la reorganización de los cromosomas en la mitosis, en la polarización neuronal y el crecimiento axónico (Zhou and Snider 2005, Hur and Zhou 2010). En la figura se pueden observar algunos de los sustratos de la GSK-3 involucrados en la regulación del desarrollo neural (figura 4).

1.5 Implicaciones de la GSK-3 en la depresión.

La primera evidencia que relacionó la GSK-3 con los trastornos del ánimo fueron dos trabajos que demostraron que el litio inhibía la GSK-3 por competición por el sitio de unión del magnesio (Stambolic and Woodgett 1994, Klein and Melton 1996, Ryves and Harwood 2001). El descubrimiento del litio como inhibidor de la GSK-3 hizo aumentar el interés científico en determinar si otras moléculas estabilizadoras del ánimo eran inhibidoras de la GSK-3. Varios estudios demostraron que el Valproato inhibe la GSK-3 (Chen, Huang et al. 1999, Werstuck, Kim et al. 2004, Kim, Shi et al. 2005). Sin embargo los efectos inhibitorios del litio y el valproato no se limitan a la GSK-3. El Valproato y el litio han demostrado inhibir de forma directa la desacetilasa HDAC1 y la enzima inositol monofosfatasa respectivamente (Atack, Broughton et al. 1995, Phiel, Zhang et al. 2001).

También se ha demostrado que los antidepresivos fluoxetina e imipramina inhiben la GSK-3 por fosforilación de la serina (Li, Zhu et al. 2004, Beaulieu, Zhang et al. 2008). Sin embargo los datos indican que la inhibición de la GSK-3 se produce a la hora de la administración aguda. Esto apunta a que la regulación monoaminérgica induce una inhibición de la GSK-3, más que a una inhibición directa. Estos datos ponen en manifiesto que la GSK-3 está involucrada en el efecto terapéutico de estos fármacos antidepresivos.

Además varios estudios han asociado la actividad de la GSK-3 con la depresión. En seres humanos se ha observado un aumento de la expresión de la GSK3- β en los

hipocampos *post-mortem* de pacientes depresivos (Oh, Park et al. 2010). También se ha visto una disminución de la pGSK-3 β ser9 (forma inactiva) y de la β -catenina en corteza prefrontal ventral de pacientes depresivos (Karege, Perroud et al. 2007, Karege, Perroud et al. 2012). Sin embargo se desconoce si estas alteraciones son causa o efecto de la enfermedad.

Han sido necesarios estudios con inhibidores de la GSK-3 y con modelos genéticamente modificados, para confirmar el papel de la GSK-3 en la depresión.

Estudios en modelos animales han demostrado que la inhibición de la GSK-3 tiene un efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado (FST del inglés forced swimming test) (Gould, Einat et al. 2004, Kaidanovich-Beilin, Milman et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008, Du, Wei et al. 2010). Aunque se desconocen las alteraciones terapéuticas que inducen estos inhibidores, varios trabajos han evaluado el papel de la GSK-3 en vías relacionadas con la depresión.

Modelos genéticamente modificados han ratificado los datos obtenidos con estrategias farmacológicas. El ratón GSK-3 $\beta^{+/-}$ ha demostrado reducir el tiempo de inmovilidad tanto en la prueba del FST como en la prueba de suspensión por la cola (TST, del inglés Tail Suspension Test) (O'Brien, Harper et al. 2004, Beaulieu, Zhang et al. 2008). Ratones inyectados bilateralmente en la formación hipocampal con lentivirus para inducir la interferencia de la GSK-3 β han replicado los mismos resultados (Omata, Chiu et al. 2011). Ratones con el gen de la GSK-3 α delecionado han mostrado reducir el tiempo de inmovilidad en el TST (Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009).

Estos resultados en su conjunto avalan la implicación de la GSK-3 en la depresión, sin embargo son menos conocidos los mecanismos por los que la inhibición de la GSK-3 induce efectos terapéuticos. Está descrito que la GSK-3 juega un papel en la neurotransmisión serotoninérgica, en la respuesta a glucocorticoides, en la proliferación y diferenciación neuronal, en la inflamación y en la respuesta a factores de crecimiento como el BDNF (del inglés brain-derived neurotrophic growth factor) entre otros (figura 5).

Varios estudios han demostrado que la serotonina (5-HT) regula la actividad de la GSK-3. Un elegante estudio demostró que la mutación en la triptófano hidroxilasa 2 induce una reducción de los niveles de 5-HT y una disminución de la inhibición de la GSK-3 (Beaulieu, Zhang et al. 2008).

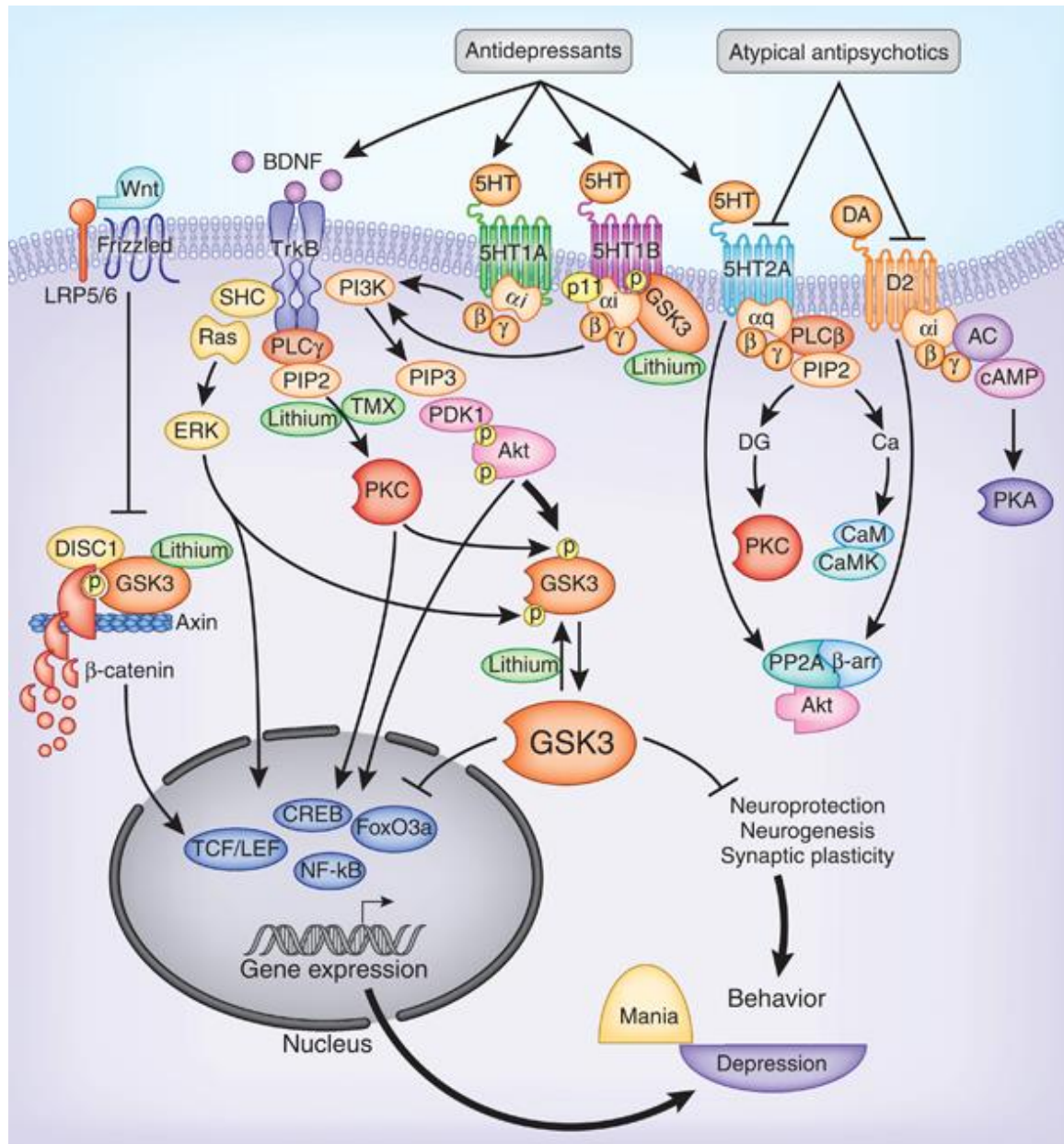


Figura 5: Señales de transducción implicadas en la depresión en las que la GSK-3 juega un papel importante. En la figura se muestran las diferentes rutas implicadas, entre las que se encuentra la vía *Wnt*, la respuesta a factores tróficos como el BDNF y los receptores de 5-HT. Nótese en las dianas de los antidepresivos, que modulan la actividad de la GSK-3 y el efecto del litio, inhibidor de la GSK-3. (Li, Frye et al. 2012).

También se ha descrito una regulación por los receptores metabotrópicos de serotonina 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}. El 5-HT_{1A} está acoplado a una proteína G inhibitoria que reduce los niveles de AMP cíclico (del inglés, Adenosine MonoPhosphate) (De Vivo and Maayani 1986) e inactiva la proteína PKA (del inglés Protein Kinase A), involucrada en la inhibición de la GSK-3. Estos receptores están involucrados en conductas relacionadas con el comportamiento depresivo y la ansiedad (Kennett, Dourish et al. 1987, Parks, Robinson et al. 1998). El receptor 5-HT_{1B} puede actuar como autorreceptor o como heterorreceptor (Bockaert, Claeyssen et al. 2006). Se localizan principalmente en el terminal axónico de la neurona presináptica y actúa como inhibidor de la liberación de serotonina (Riad, Garcia et al. 2000). La actividad del receptor 5-HT_{1B}, al igual que el 5-HT_{1A}, está acoplada a una proteína G inhibitoria que reduce los niveles de AMP cíclico (Bouhelal, Smounya et al. 1988) e inactiva la proteína PKA involucrada en la inhibición de la GSK-3.

Además la GSK-3 regula la actividad del receptor 5-HT_{1B} (figura 6). La GSK-3 interacciona de manera directa con el receptor y facilita la transmisión de la señal mediante la proteína G (Chen, Salinas et al. 2009). En ausencia de la GSK-3, los receptores 5-HT_{1B} se disocian de la proteína G, pero siguen respondiendo a la β -arrestina 2, que internaliza el receptor (Chen, Zhou et al. 2011). También se ha descrito posible existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa de la actividad de la GSK-3. La GSK-3 y la activación del receptor promueven la activación de Akt (Chen, Zhou et al. 2011), siendo esta una de las principales quinasas que regulan la inhibición de la GSK-3 por la fosforilación de la Ser9.

Ratones genéticamente modificados con el gen de la GSK-3 β deleciónado en neuronas serotoninérgicas han demostrado incrementar la neurotransmisión serotoninérgica, sin embargo esta deleción no ha sido suficiente para reducir el tiempo de inmovilidad tanto en la prueba del TST (Zhou, Chen et al. 2012). Estos resultados nos indican que la regulación serotoninérgica no parece ser la responsable del efecto antidepresivo observado con los inhibidores de la GSK-3.

Se piensa que algunos de los efectos de los glucocorticoides (GCs) están mediados por la GSK-3. Se ha demostrado que la dexametasona (DEX), agonista de los GCs induce la activación de la GSK-3 β inhibiendo la fosforilación en la Ser9 y promoviendo la fosforilación en Tyr216 en cultivos de progenitores hipocampales adultos (Garza, Guo et al. 2012). La inhibición de la GSK-3 con litio y recientemente con valproato han demostrado revertir las alteraciones en la proliferación inducidas por la administración de DEX vía GSK-3 β (Boku, Nakagawa et al. 2009, Boku, Nakagawa et al. 2013).

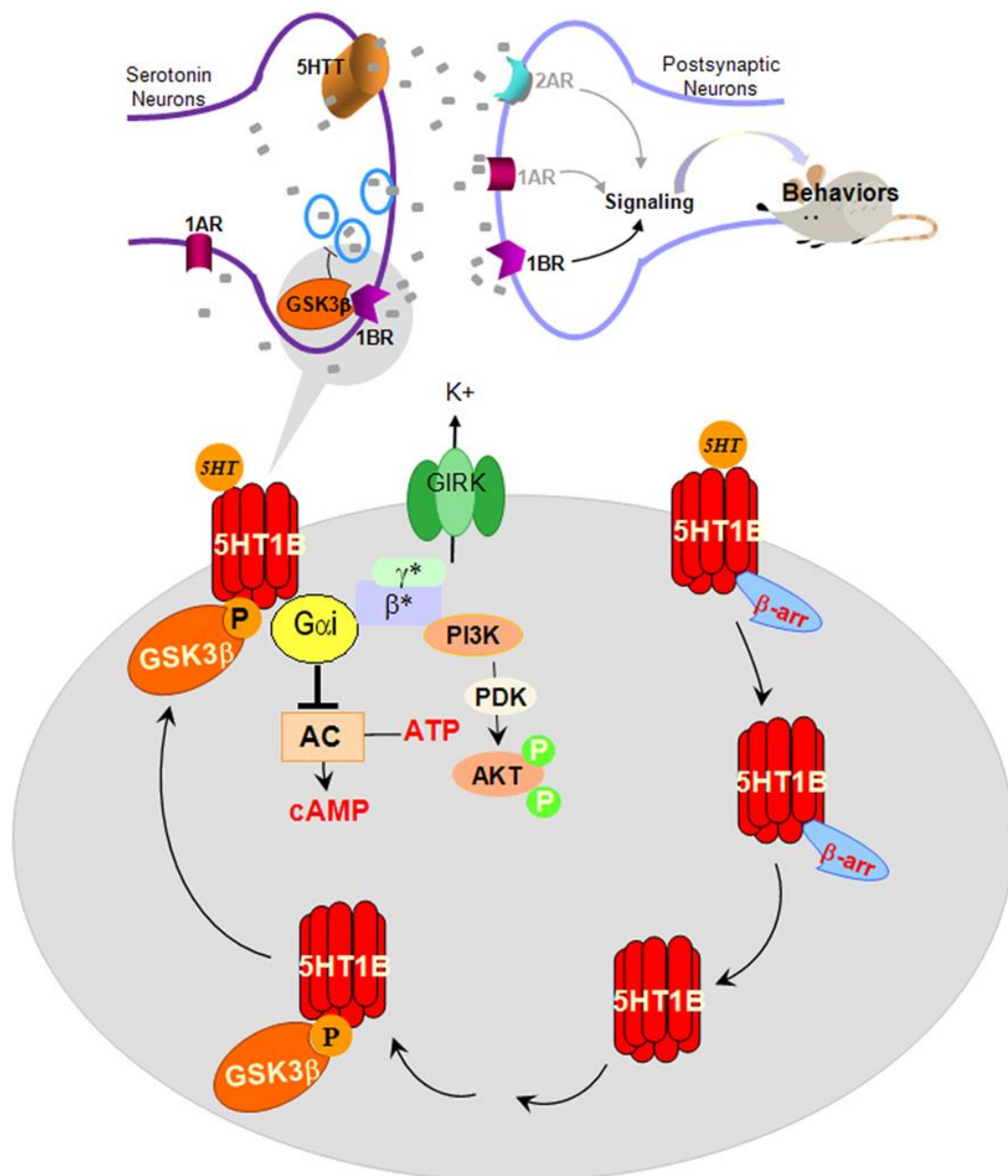


Figura 6: Efectos de la GSK-3 sobre la regulación de los receptores 5-HT1B. Se puede observar en la neurona presináptica como la unión de la 5-HT al receptor

acompañado de la actividad de la GSK-3 induce la reducción de AMP cíclico y la activación de Akt. En ausencia de la GSK-3, el receptor se internaliza por la unión de la β -arrestina 2. La actividad del receptor promueve la inhibición de la liberación de 5-HT, esto genera una disminución de la actividad serotoninérgica con sus respectivas consecuencias conductuales. (Polter and Li 2011).

En la última década se han incrementado los trabajos que demuestran que la depresión está asociada con una activación del sistema inmune y la consecuente inflamación (Patel 2013). La GSK-3 es un potente inductor de la inflamación (Martin, Rehani et al. 2005). La inhibición de la GSK-3 han demostrado ejercer un potente efecto antiinflamatorio (Yuskaitis and Joep 2009, Klammer, Song et al. 2010, Morales-Garcia, Palomo et al. 2014).

Recientemente se ha propuesto que un tratamiento antidepresivo efectivo requiere aumentar la tasa neurogénica. El litio y el Valproato han demostrado tener un efecto proneurogénico (Chen, Rajkowska et al. 2000, Hao, Creson et al. 2004, Hsieh, Nakashima et al. 2004, Silva, Mesquita et al. 2008, Wexler, Geschwind et al. 2008, Boku, Nakagawa et al. 2009, Sintoni, Kurtys et al. 2013). Sin embargo se desconoce si el mecanismo de acción es mediante la inhibición de la GSK-3. Aunque actualmente solo un trabajo ha descrito el efecto proneurogénico de un inhibidor selectivo de la GSK-3 (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012), está descrito el efecto proneurogénico que induce la activación de la vía canónica de *Wnt* (Lie, Colamarino et al. 2005).

El BDNF es la neurotrofina más abundante en el cerebro. Cambios en los niveles de BDNF han sido implicados tanto en la etiología de la depresión como en la acción de los fármacos antidepresivos (Groves 2007). La GSK-3 β es un inhibidor potencial de la neurotrofina. (Foulstone, Tavaré et al. 1999). El tratamiento con litio aumenta los niveles de BDNF en cultivos celulares, en modelos animales de depresión y en sujetos humanos depresivos (Mai, Joep et al. 2002, Angelucci, Aloe et al. 2003, Ricken, Adli et al. 2013). Un trabajo reciente ha descrito que mientras la administración de litio eleva los niveles de BDNF el uso de un inhibidor selectivo de la GSK-3 no induce este efecto (Caberlotto, Carboni et al. 2013).

1.6 Inhibidores de la GSK-3.

El litio fue el primer inhibidor de la GSK-3 utilizado en la práctica clínica. Aunque *in vitro* la inhibición sobre la GSK-3 es débil, una concentración de 1mM inhibe la actividad de la GSK-3 entre el 25-50% (el porcentaje varía en función de la concentración de magnesio utilizado en el ensayo), a concentraciones fisiológicas de magnesio se estima una inhibición del 50% (Gurvich and Klein 2002). Aunque su efecto inhibitorio puede ser incrementado por la inducción de la inactivación de la quinasa por la fosforilación del residuo Ser21/9 (Chalecka-Franaszek and Chuang 1999). Posteriormente se demostró que el Valproato inhibía la GSK-3 (Chen, Huang et al. 1999, Werstuck, Kim et al. 2004, Kim, Shi et al. 2005). Sin embargo ambas moléculas están involucradas en la regulación de otras vías de señalización, como ya se ha mencionado previamente.

Debido al importante papel que juega la GSK-3 en los trastornos del ánimo, así como en otras patologías, se ha puesto un especial interés en el desarrollo de nuevas moléculas con capacidad inhibitoria de la quinasa (figura7).

Se pueden clasificar los inhibidores en función del mecanismo de inhibición que tiene en la quinasa:

Inhibidores competitivos por el sitio de unión de magnesio: pequeños metales catiónicos como el litio (Klein and Melton 1996, Stambolic, Ruel et al. 1996) o el Zinc (Ilouz, Kaidanovich et al. 2002).

Inhibidores ATP-competitivos. La mayoría de los inhibidores desarrollados compiten por el sitio de unión al ATP (del inglés, Adenosine TriPhosphate). Pueden ser de origen marino o de síntesis orgánica. Tienen la desventaja que al competir por una región muy conservada pueden no ser selectivos. Varios de estos inhibidores han sido comercializados como el tiazol AR-A014418 (Bhat, Xue et al. 2003) (Sigma-Aldrich y Tocris bioscience) o los derivados de la maleimidias SB-41528 y SB-216763 (Coghlan, Culbert et al. 2000) (Sigma-Aldrich, Tocris bioscience y Santa Cruz Biotech).

Inhibidores no ATP-competitivos. Los inhibidores diseñados para dirigirse al dominio de unión con el sustrato pueden ser más específicos que los anteriormente

mencionados. Estos pueden ser de origen marino, de síntesis orgánica o pequeños péptidos. En esta categoría se encuentra el L803-mts, las tiadiazolidindionas (TDZDs) (Martinez, Alonso et al. 2002) y las halometilcetonas (HMKs)(Conde, Perez et al. 2003).

Type	Source	Inhibitor	Inhibition potency (IC ₅₀)	Biological activity in CNS	Drug development state
Cations	Inorganic atom	Lithium	2 mM	Mood stabilizer, neuroprotection, therapeutic benefits (tau and amyloid) in AD models (1-9).	Drug of reference for bipolar disorders. Conflicting results in the clinic for AD.
		Zinc	15 μ M	Antidepressant (10, 11).	----
		Tungstate	Indirect inhibition	Decrease tau phosphorylation (12).	Phase I as antiobesity agent
ATP-competitives	Marine organism	Iridurubins	5-50 nM	Neuroprotection, axon formation, maintain pluripotency, reduced tau phosphorylation (13-16).	Pre-clinical
		6-BIO	1.5 μ M		
		Hymenialdisine	10 nM	Decrease tau phosphorylation, neuroprotection (17).	Pre-clinical
		Dibromocantharelline	3 μ M		
	Organic synthesis	Meridianins		Decrease tau phosphorylation (18).	-----
		Aminopyrimidines CT98014 CT98023 CT99021	0.6-7 nM	Block LTD, maintain pluripotency, enhance neurite outgrowth, supports cell renewal of ESC, reduce tau phosphorylation (5, 19-22).	-----
		TWS119		Induces neuronal differentiation. Support self renewal of ESC (23).	-----
		Arylindolemaleimide SB-216763 SB-41528	34 nM 77 nM	Neuroprotection, induce axon formation, shows therapeutic benefits in AD and schizophrenic models(5, 9, 24-32).	Pre-clinical
		Thiazoles AR-A014418 AZD-1080	104 nM n.r.	Neuroprotection, shows antidepressive and anti-manic activity, shows therapeutic benefits in AD and ALS model (33-39).	----- Withdraw from clinical phase I
		Paulones Kenpaulone Alsterpaulone Cazpaulone	4-80 nM	Neuroprotection, blocks LTD, reduces A β production, reduces tau phosphorylation (19, 26, 40-45)	Pre-clinical
		Aloisines	0.5-1.5 μ M	Blocks cell proliferation (46).	-----
Type	Source	Inhibitor	Inhibition potency (IC ₅₀)	Biological activity in CNS	Drug development state
Non-ATP competitives	Marine organism	Manzamines Manzamine A	1.5 μ M	Decrease tau phosphorylation (47).	-----
		Furanosquiterpenes Palinurine Tricantine	4.5 μ M 7.5 μ M	Decrease tau phosphorylation	-----
	Organic synthesis	Thiadiazolidindiones TDZD-8 NP00111 NP031115 NP031112(tideglusib)	2 μ M 2 μ M 4 μ M n.r.	Neuroprotection, decrease tau phosphorylation, beta-amyloid and gliosis in vivo, antidepressants, affects locomotor activity and reverse schizophrenic like behavior, promotes tissue recovery after spinal cord injury (48-55).	----- ----- ----- Phase II as orphan drug for PSP Phase Iib for AD
		Halomethylketones HMK-32	1.5 μ M	Neuroprotection, decrease tau phosphorylation (56).	-----
	Peptides	L803-mts	40 μ M	Neuroprotection, antidepressive activity, axon morphogenesis (14, 57-59).	Pre-clinical

Figura 7: Inhibidores de la GSK-3 agrupados por su mecanismo de inhibición y su origen. Para las citas incluidas en la tabla véase (Eldar-Finkelman and Martinez 2011).

2. Neurogénesis adulta.

2.1. Connotaciones históricas y conceptos generales.

La neurogénesis en su sentido más amplio es la generación de nuevas neuronas en el sistema nervioso central (SNC). La neurogénesis adulta comprende varios procesos: proliferación, migración, diferenciación, maduración y supervivencia celular. En el campo del neurodesarrollo, se conoce como neurogénesis el momento del nacimiento de la células post-mitótica que se va a diferenciar en neurona.

El SNC tiene un poder de regeneración y reparación muy limitado en comparación con otros tejidos o sistemas. El dogma clásico determinaba que la neurogénesis se limitaba al desarrollo embrionario y postnatal temprano y que la población neuronal del individuo adulto no podía ser reemplazada (Ramón y Cajal 1928). Aunque se habían detectado figuras mitóticas en el cerebro de animales adultos, siempre se relacionaron con la generación de células gliales. La heterogeneidad celular y la complejidad estructural del SNC parecían explicar la ausencia de recambio neuronal en el cerebro adulto.

En la década de 1960, la introducción del uso de la timidina tritiada y las técnicas autorradiográficas permitieron la detección de células en fase de síntesis de ADN en tejido nervioso de animales adultos. Con estas técnicas se detectó la existencia de neurogénesis en el bulbo olfatorio, formación del hipocampo y neocorteza cerebral (Altman and Das 1965, Altman 1969).

Hubo que esperar hasta la década de 1990 para que empezara a derrumbarse el dogma clásico y se aceptara la existencia de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos, incluido el hombre. La introducción del uso de la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) fue determinante para estos descubrimientos (Corotto, Henegar et al. 1993). La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de células en proliferación y puede detectarse por inmunohistoquímica.

El descubrimiento de la neurogénesis en el adulto representa un hito en la historia de la neurobiología que ha abierto nuevos campos de investigación. Aunque sigue siendo válida la afirmación de que las neuronas maduras han perdido la capacidad de dividirse, se ha constatado que en el cerebro adulto persisten poblaciones de células madre o precursores neurales con capacidad para proliferar y generar neuronas y células gliales.

Se ha encontrado evidencia de la neurogénesis en la mayoría de grupos de vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (incluyendo primates no-humanos y humanos) (Altman 1963, Alvarez-Buylla and Nottebohm 1988, Alvarez-Buylla and Lois 1995, Suhonen, Peterson et al. 1996, Gould, Reeves et al. 1999, Kempermann 2012). Sin embargo resulta destacable que sistemas nerviosos más primitivos tienden a presentar altos niveles de neurogénesis adulta, lo contrario que sucede en cerebros más complejos cuya plasticidad se encuentra limitada a favor de la estabilidad (Abraham and Robins 2005).

Las células con actividad mitótica en el SNC pueden clasificarse en dos grupos: las células madre neurales o NSC (en inglés neural stem cells) capaces de generar cualquier linaje neural y los precursores neurogénicos, restringidos a uno o pocos linajes neuronales (Kempermann 2006, Gage, Kempermann et al. 2008). La autorrenovación o diferenciación de las NSC a células más comprometidas depende de modificaciones en la expresión génica. Las NSC pueden generar uno o dos tipos celulares en función de si realizan una división simétrica o asimétrica respectivamente (Kempermann 2006, Gage, Kempermann et al. 2008).

En el individuo adulto no existen NSC *in vivo*. En su lugar existen precursores neurales, con capacidad de autorrenovación, pero incapaces de generar todos los linajes neurales. Algunos autores llaman NSC adultas a los precursores, pero nosotros vamos a mantener la nomenclatura de NSC a aquellas capaces de generar todo los linajes y precursores a aquellas restringidas a generar uno o unos pocos linajes neuronales.

2.2 Regiones neurogénicas y no neurogénicas del cerebro.

Aunque se han aislado precursores neurales de varias regiones del cerebro adulto e *in vitro* son capaces de generar neuronas, en mamíferos, la neurogénesis adulta en condiciones fisiológicas está restringida a dos zonas concretas: la zona subventricular (SVZ del inglés SubVentricula Zone) adyacente a los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ del inglés SubGranular Zone) del giro dentado (GD) en la formación hipocampal. Estos datos resaltan la importancia del nicho neurogénico y de la permisividad neurogénica, revisada por (Kempermann 2006).

Una zona neurogénica se caracteriza por poseer una matriz germinativa que genera una producción significativa de neuronas a lo largo de toda la vida del individuo. Además requiere que cuando un progenitor sea trasplantado en ella debe generar una neurona, sin embargo, si es trasplantado en una región no neurogénica debe originar una célula glial o activar un mecanismo de muerte celular.

Por tanto este concepto de permisividad es fundamental a la hora de hacer distinciones entre zonas neurogénicas del cerebro y no neurogénicas. Esta permisividad depende de factores específicos que permiten la diferenciación e integración neuronal en el circuito pre-existente. En ellos están factores difusibles o interacciones célula a célula. El conjunto de tipos celulares que engloba una zona neurogénica actúa como una unidad funcional (Kempermann 2006). Está descrito que los astrocitos del GD promuevan la actividad de los precursores en el GD (Song, Stevens et al. 2002), la microglia ha mostrado ser un importante efector en la reorganización del circuito neuronal así como en la liberación de factores tróficos como el IGF-1 o el BDNF (Gemma and Bachstetter 2013). También se ha observado el papel vascular en el nicho neurogénico. Dada la fuerte asociación entre ambos procesos algunos autores se refieren a las zonas germinativas como nichos vasculares (Palmer, Willhoite et al. 2000). También se han observado diferencias en la composición de la matriz extracelular, indicando que estos componentes pueden estar involucrados en la permisividad neurogénica (Imbeault, Gauvin et al. 2009).

Se han encontrado precursores en varias regiones no-neurogénicas como el cuerpo calloso y nervio óptico (Palmer, Markakis et al. 1999), la *substancia nigra* (Lie, Dzieczapolski et al. 2002), hipotálamo (Markakis, Palmer et al. 2004) e incluso en la

médula espinal (Weiss, Dunne et al. 1996). Sin embargo su capacidad neurogénica está limitada, en condiciones fisiológicas generan células gliales, pero *in vitro* o con un entorno neurogénico permisivo son capaces de generar neuronas (Palmer, Ray et al. 1995, Suhonen, Peterson et al. 1996, Kempermann 2006).

Aunque se han descrito dos nichos neurogénicos en el cerebro adulto, la SVZ y la SGZ, también denominada neurogénesis hipocampal adulta (AHN, del inglés Adult Hippocampal Neurogenesis). Sólo vamos a profundizar en la AHN ya que es el nicho estudiado en la presente tesis doctoral.

2.3 Neurogenesis hipocampal adulta (AHN).

La AHN da lugar a nuevas neuronas granulares que se integran funcionalmente en el giro dentado y que forman parte del circuito trisináptico de la formación hipocampal. Para comprender plenamente la implicación funcional de la AHN es necesario hacer una pequeña introducción de la estructura de la formación hipocampal y su función.

2.3.1 Estructura de la formación hipocampal y sus funciones.

El hipocampo es una estructura bilateral que se encuentra en los lóbulos temporales de ambos hemisferios (figura 8).

En la formación hipocampal se pueden diferenciar las siguientes regiones: la *fascia dentata* o giro dentado (GD) y el *cornu ammonis* o cuerno de Ammon (CA) que se divide en CA1, CA2 y CA3 y finalmente *el presubiculum* y *subiculum*.

Las regiones GD y CA están formada por varias capas o estratos. El GD está compuesto por 3 capas: una capa de células granulares (GCL, del inglés Granular Cell Layer) que forma dos hojas, la capa del hilus y la capa molecular (MCL del inglés Molecular Cell Layer), que rodea externamente la GCL. El *cornu ammonis* o cuerno de Ammon compuesto por 4 capas: 2 capa moleculares internas denominadas *stratum lacunosum moleculare* y *stratum radiatum*, la capa de neuronas piramidales y la zona molecular externa o *stratum oriens*. Y (figura 8).

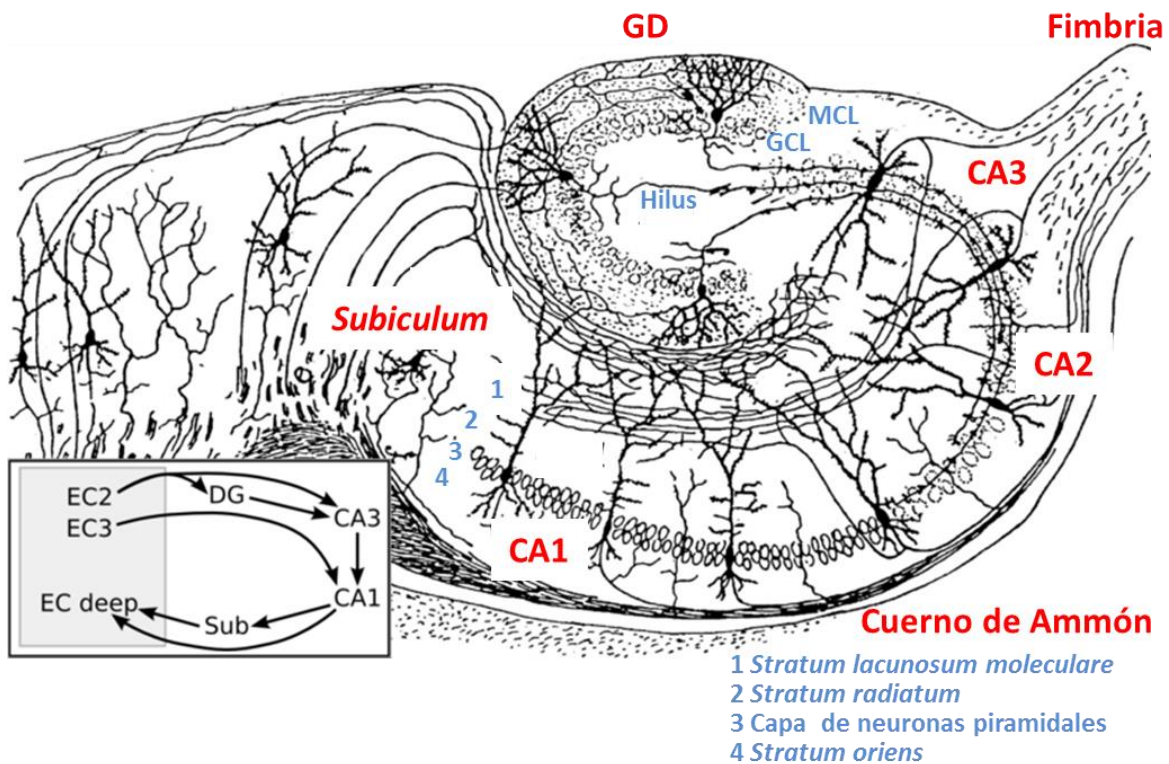


Figura 8: Estructura y circuito sináptico del hipocampo de ratón. Modificado de Santiago Ramón y Cajal.

El GD y la región CA forman un circuito trisináptico de procesamiento de la información. La primera sinapsis tiene lugar entre las vías aferentes de la corteza entorrinal (vía perforante) y las dendritas de las células granulares del giro dentado. Los axones de estas neuronas que forman las fibras musgosas inervan las neuronas piramidales de CA3 y generando la segunda sinapsis del circuito. Finalmente las piramidales de CA3 envían la información por los axones denominados colaterales de Schaffer a contactar con CA1, dando lugar a la tercera sinapsis del circuito. El axón de CA1 proyecta al *subiculum*, y de ahí la información se proyecta de nuevo a la corteza entorrinal.

Una tercera vía de entrada de información (modulatoria) son las aferencias procedentes del septo, hipotálamo y tronco del encéfalo a través del fornix que contacta con las dendritas basales de las neuronas piramidales de CA1.

Las funciones del hipocampo se han relacionado con la adquisición y consolidación de memorias y con el mantenimiento del estado del ánimo.

Evidencias tanto experimentales como de pacientes con daños en la formación hipocampal han revelado que esta región está implicada en la formación y consolidación de memorias a largo plazo (Scoville and Milner 1957, Zola-Morgan, Squire et al. 1994, Vargha-Khadem, Gadian et al. 1997).

El hipocampo forma parte del sistema límbico, que engloba las áreas del cerebro relacionadas con la emoción y las vías que las interconectan. El sistema límbico además de influir sobre la emoción, lo hace sobre las funciones cognitivas como la memoria (McGaugh, Cahill et al. 1996). También se ha visto una relación entre el volumen hipocampal y la depresión, detectándose reducciones en el volumen hipocampal de pacientes depresivos (Lupien, Evans et al. 2007, Pruessner, Dedovic et al. 2010, Ahdidan, Hviid et al. 2011, Lucassen, Pruessner et al. 2014). Aunque esta reducción volumétrica está ampliamente extendida entre los pacientes con MDD (Kempton, Salvador et al. 2011), se desconoce si es causa o efecto de la patología.

2.3.2 La zona subgranular del giro dentado.

In vivo, los progenitores se encuentran en una estrecha banda de tejido, la SGZ. Los primeros anatomistas no reconocieron esta zona como una estructura que requiriese un nombre específico. No recibió el nombre específico de SGZ hasta que Altman en 1965 describió la neurogénesis en esta región (Altman and Das 1965).

La SGZ se encuentra en un entorno neurogénico que permite la formación de nuevas neuronas a lo largo de la vida del individuo. Tanto progenitores como neuronas inmaduras conviven en un mismo nicho con neuronas maduras, diferenciadas y funcionales.

Desde el nacimiento en la SGZ hasta la integración funcional, la progenie del precursor avanza por una serie de etapas secuenciales que comprenden los procesos de proliferación, migración, diferenciación y maduración funcional. Se han propuesto varias terminologías para denominar las células que comprenden las diferentes etapas. Aquí vamos a mostrar la terminología propuesta por Kempermann que está basada en

criterios morfológicos, así como a la expresión de ciertos marcadores característicos de cada estadio (Kempermann 2006).

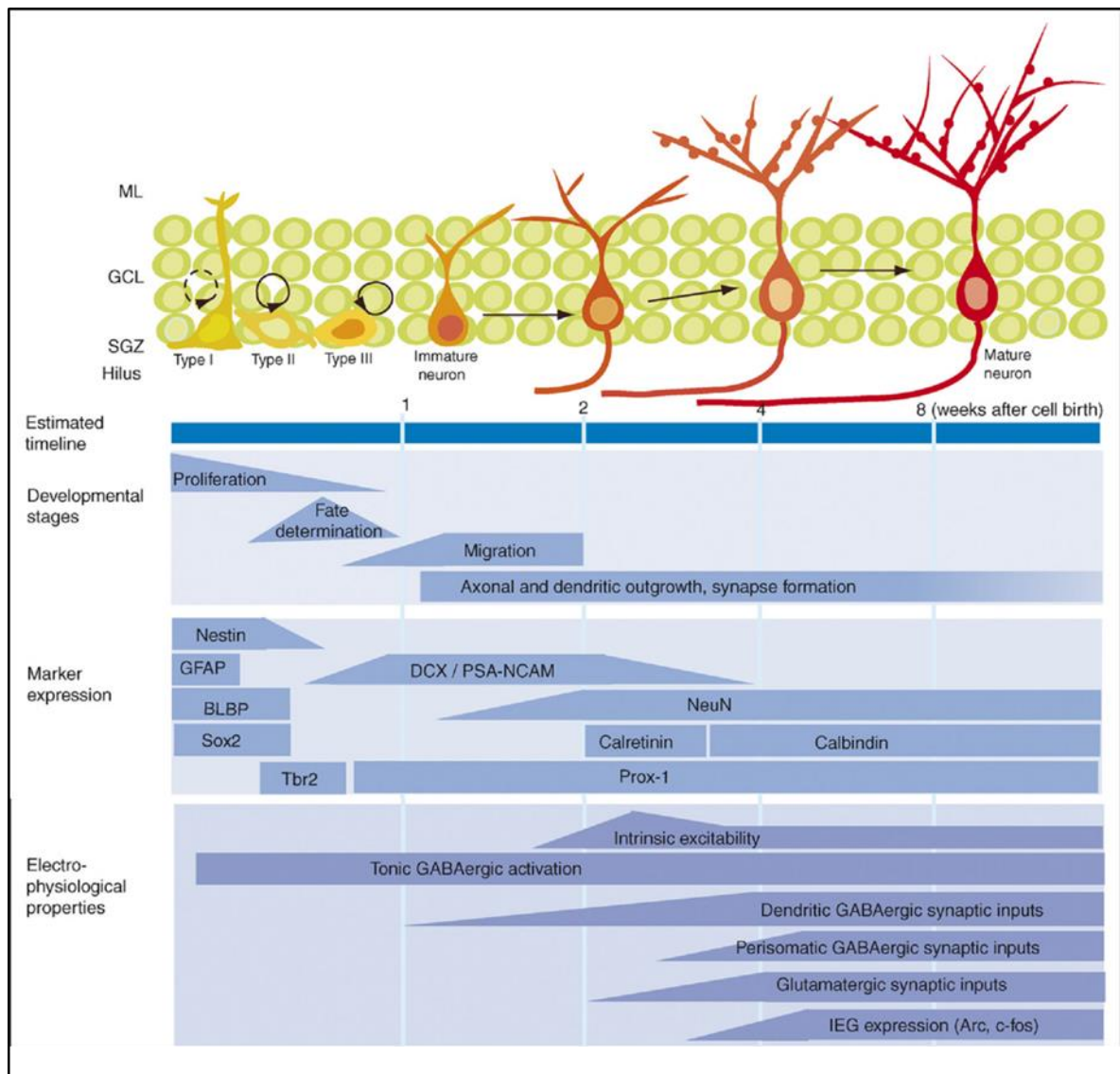


Figura 9: Representación esquemática del proceso de AHN en el GD de la formación hipocámpica. Representación esquemática de los distintos estadios celulares desde el precursor hasta la célula granular madura. Para cada estadio se muestran la expresión de marcadores que los caracterizan. Además se muestran las características electrofisiológicas de cada uno de los estadios. Modificado de (Duan, Kang et al. 2008)

Las células tipo 1 o precursores. Se localizan en la parte más interna del giro dentado, de cara hacia el hilus. Presentan una morfología que recuerda a la glía radial

presente durante el desarrollo, con una prominente prolongación apical y diversas terminaciones basales fuertemente asociadas con los vasos sanguíneos. Pueden dividirse con una división simétrica o asimétrica (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Los marcadores moleculares son GFAP, nestina, BLBP y Sox2. Electrofisiológicamente tienen las propiedades pasivas de los astrocitos y corrientes de potasio (Filippov, Kronenberg et al. 2003) (figura 9).

Las células tipo 2 o progenitores. También se localizan en la parte más interna del giro dentado. Presentan procesos cortos paralelos a la SGZ y son altamente proliferativas. Forman *clusters* que se acumulan en las proximidades de los vasos sanguíneos. Se subdividen en dos tipos celulares en función de si expresan la proteína doblecortina (DCX), las tipo 2^a no la expresan y las tipo 2b sí (Kronenberg, Reuter et al. 2003). Las células tipo 2 son el intermedio entre la glía radial y el neuroblasto en vías de diferenciación. Expresan nestina, BLBP, Sox2 y pueden expresar o no GFAP. Las tipo 2b además expresan DCX (figura 9).

Las células tipo 3: Tienen capacidad de dividirse, pero muy pocas lo hacen. Las prolongaciones horizontales incrementan su longitud y comienzan a desarrollar los primeros procesos verticales, siendo posible encontrar células con sus prolongaciones orientadas en todas las direcciones intermedias. Expresan Prox1, DCX y PSA-NCAM. Electrofisiológicamente hablando este estadio es bastante heterogéneo, hay tanto células con propiedades de las células tipo 1, como algunas comenzando a expresar signos de neurona. En esta etapa comienzan las primeras aferencias GABAérgicas de carácter tónico (figura 9).

Las neuronas inmaduras: Estás células no tienen capacidad proliferativa. En esta fase adquieren la morfología con orientación vertical y la dendrita apical se alarga y fortalece y se hace claramente visible en inmunohistoquímica. Este estadio de diferenciación se caracteriza por la expresión transitoria de calretinina (Calret), que posteriormente cesa y en su lugar se activa la expresión de la calbindina que se mantiene en las neuronas maduras. Además expresan Prox1, NeuN, y algunas DCX y PSA-NCAM (figura 9). Tras la salida de ciclo se produce la elongación del axón hasta CA3 donde establecen contacto con las dendritas de neuronas piramidales (Hastings

and Gould 1999, Zhao, Teng et al. 2006). Comienzan a recibir aferencias glutamatérgicas de la vía perforante y aferencias GABAérgicas dendríticas (Esposito, Piatti et al. 2005) y culminan con la formación de contactos GABAérgicos perisomáticos (figura 9). El primer signo de madurez funcional es la capacidad de generar potenciales de acción. Sin embargo estas neuronas inmaduras difieren de las maduras tanto en sus propiedades activas como pasivas. Recientemente se ha propuesto la hipótesis que sugiere que las diferentes subpoblaciones inmaduras pueden tener un papel diferente, en función de su estado de maduración y basado en sus propiedades electrofisiológicas inmaduras (Perez-Domper, Gradari et al. 2013, Gradari, Perez-Domper et al. 2014).

De las nuevas células que se generan cada día en la SGZ, una gran parte muere en poco tiempo. Se ha estimado que en condiciones normales alrededor del 50% de las nuevas células generadas mueren durante el primer mes y parece que después la tasa de muerte se reduce considerablemente (Dayer, Ford et al. 2003). La decisión de supervivencia o muerte celular depende del balance entre señales antiapoptóticas y proapoptóticas. Los factores de crecimiento y de la capacidad de establecer contactos sinápticos funcionales con otras neuronas establecen los principales mecanismos de supervivencia (Perez-Domper, Gradari et al. 2013). Aunque la compleja regulación de la AHN por los glucocorticoides no es del todo conocida en términos generales, la elevación de los glucocorticoides como respuesta a un estrés es considerada el principal regulador negativo de la AHN (Gould, Woolley et al. 1991, Bai, Bergeron et al. 2003).

2.4 Regulación de la AHN.

Aunque existen numerosos mecanismos implicados en la regulación de la AHN, entre los que están los factores de crecimiento como el FGF-2, el IGF-1 o el VEGF, las neurotrofinas como el BDNF, los neurotransmisores como GABA, el glutamato, la acetil colina (ACh), la serotonina (5-HT) o el óxido nítrico y moléculas difusibles de origen intrínseco y extrínseco, nosotros nos vamos a centrar en los efectos regulatorios inducidos por la familia *Wnt* y el estrés por su relación con la GSK-3 y la depresión.

2.4.1 Regulación de la AHN por *Wnt*.

La familia *Wnt* tiene un papel crucial en el desarrollo y además la vía de señalización *Wnt* es una ruta clave en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta (Lie, Colamarino et al. 2005, Varela-Nallar and Inestrosa 2013). La señalización autocrina de *Wnt* regula la proliferación y multipotencialidad de los progenitores por la vía canónica (Wexler, Paucer et al. 2009). *Wnt-3* se expresa en los astrocitos del hipocampo adulto, así como en la SGZ *in vivo* (Lie, Colamarino et al. 2005). La sobreexpresión de *Wnt-3* es suficiente para incrementar la neurogénesis, así como el bloqueo de su señal reduce drásticamente la neurogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (Lie, Colamarino et al. 2005). Además se ha demostrado *in vitro* que la señal de *Wnt3* vía astrocitaria promueve la diferenciación (Lie, Colamarino et al. 2005). Además parece que el gen *Prox1* está regulado por la vía canónica de *Wnt* (Karalay, Doberauer et al. 2011). Aunque estos estudios proporcionan datos suficientes para evidenciar el papel crucial de la señal de *Wnt* en la regulación de la neurogénesis adulta en el hipocampo, es necesario seguir investigando los mecanismos de señalización para dilucidar el papel exacto *in vivo* y los mecanismos por los cuales *Wnt* es capaz de controlar la diferenciación y proliferación de los precursores hipocampales.

2.4.1 Regulación de la AHN por estrés.

La activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA, del inglés Hypothalamus-Pituitary-Adrenal) comienza por la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés corticotropin-releasing hormone) en el núcleo paraventricular (PVN, del inglés paraventricular nucleus) que induce la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH del inglés, adrenocorticotrophic hormone) de la hipófisis que finalmente induce la liberación de cortisol/corticosterona (en humanos/roedores respectivamente) de las glándulas adrenales. El cortisol/corticosterona a su vez induce una retroalimentación negativa, inhibiendo la producción de CRH y ACTH, tras su unión a los receptores de glucocorticoides (GRs, del inglés glucocorticoid receptors) y a los receptores de mineralocorticoides (MRs, del inglés mineralocorticoid receptor) del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (figura 10).

En niveles fisiológicos, los GC son necesarios para el correcto funcionamiento de la AHN (Gould, Woolley et al. 1991), sin embargo exposiciones prolongadas al estrés elevan los niveles de GC hasta concentraciones aberrantes y suponen pasar de una situación fisiológica a una patología (de Kloet, Joels et al. 2005). El exceso de GC se relaciona habitualmente con alteraciones perjudiciales en la excitabilidad hipocampal, LTP y memoria (Gage, Kempermann et al. 2008). El estrés y los GC son de los inhibidores más potentes de la neurogénesis adulta en el DG (Mirescu and Gould 2006). Los niveles aumentados de GC no sólo inhiben la proliferación sino que también disminuyen la supervivencia y diferenciación de las neuronas recién generadas (Mayer, Klumpers et al. 2006).

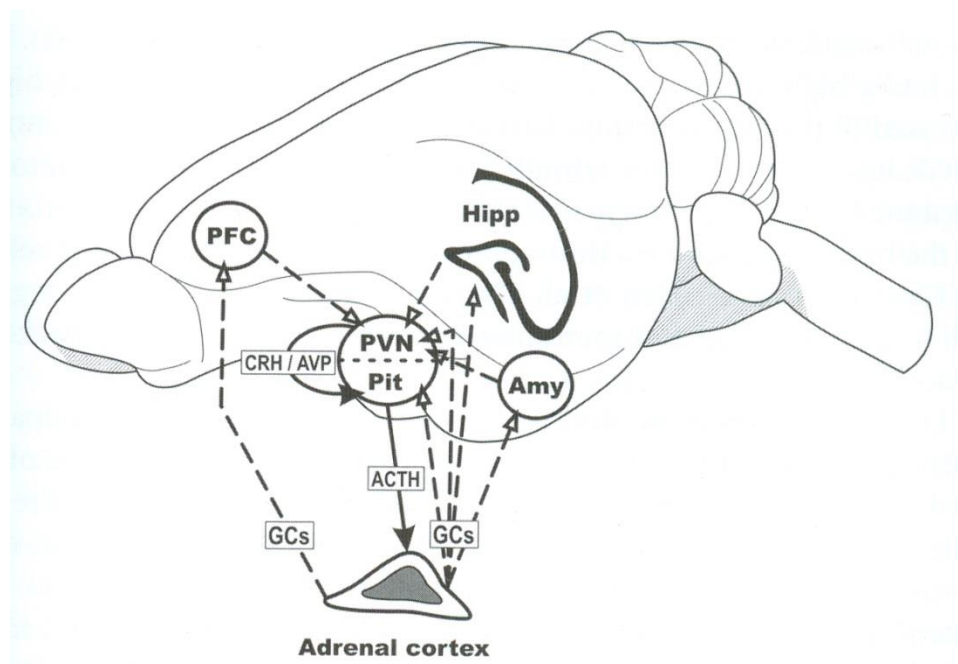


Figura 10: Esquema del eje hipotálamo-hipofisis-adrenales y sus efectos. Para más información véase el texto. Las líneas sólidas representan efectos estimulatorios y las líneas intermitentes representan efectos principalmente inhibitorios. Las siglas significan: Amy amígdala; GC glucocorticoides; Hipp hipocampo; PFC corteza prefrontal y Pit glándula hipofisaria. (Gage, Kempermann et al. 2008).

2.5 Funciones de la neurogénesis hipocampal adulta.

La neurogénesis hipocampal adulta ha sido asociada a procesos de plasticidad fisiológica, con el fin de mantener las capacidades de adaptación al ambiente. Del mismo modo, la disminución de la tasa neurogénica, presente de forma fisiológica en el envejecimiento, ha sido asociada a procesos patológicos que conllevan un deterioro cognitivo (Zhao, Deng et al. 2008).

Las neuronas generadas *de novo* se insertan en circuitos ya existentes involucrados en tareas de aprendizaje (Abrous, Koehl et al. 2005, Leuner, Gould et al. 2006, Deng, Aimone et al. 2010). La AHN también tiene implicaciones funcionales en el mantenimiento de los estados de ánimo (Zhao, Deng et al. 2008). Diversas evidencias experimentales indican que las alteraciones psiquiátricas, incluyendo la depresión, están relacionadas con la AHN (Tanti and Belzung 2013). También se ha relacionado la AHN con procesos patológicos neurodegenerativos como el Alzheimer o el Parkinson (Zhao, Deng et al. 2008).

A continuación profundizaremos en las implicaciones funcionales de la AHN en las tareas de aprendizaje y memoria y en la depresión.

2.5.1 Implicación funcional de la AHN en el aprendizaje y la memoria.

Estudios con animales de experimentación han relacionado funcionalmente la generación de nuevas neuronas en el DG con ciertas formas de aprendizaje asociativo dependientes de la formación del hipocampo. Se ha descrito que el aprendizaje de una tarea de condicionamiento del parpadeo con un paradigma de traza (que depende de la función hipocampal) se ve impedido por la reducción de la neurogénesis tras el tratamiento con un agente citostático (Shors, Townsend et al. 2002).

Aunque existe cierta controversia, parece que es necesario un correcto funcionamiento de la neurogénesis hipocampal adulta para realizar tareas de memoria espacial como es el laberinto acuático de Morris (MWM del inglés, Morris Water maze) (Dupret, Revest et al. 2008, Zhang, Zou et al. 2008, Garthe, Behr et al. 2009, Hu, Sun et al. 2009, Snyder, Soumier et al. 2011, Garthe and Kempermann 2013, Gil-Mohapel, Brocardo et al. 2013, Hagemann, Paylor et al. 2013). Algunos autores han descrito que

una disminución de la neurogénesis correlaciona con las deficiencias en el aprendizaje y la memoria en el envejecimiento (Drapeau, Mayo et al. 2003, Nyffeler, Yee et al. 2010)

Del mismo modo existe cierta controversia a la hora de ver efectos procognitivos en el MWM por un incremento de la neurogénesis hipocampal (Monteiro, Moreira et al. 2013, Touyarot, Bonhomme et al. 2013). Contrariamente a los efectos procognitivos del incremento de la AHN, algunos estudios han demostrado que una mayor diferenciación y supervivencia están asociados a un peor rendimiento en el MWM (Bizon and Gallagher 2003, Bizon, Lee et al. 2004). Trabajo del laboratorio ha demostrado que en un paradigma de estrés, realizado 2 o 3 semanas antes de un MWM, los animales con menos neuronas estas subpoblaciones de neuronas inmaduras aprendieron mejor durante la adquisición que los animales controles. A su vez el grupo control manifestó durante la extinción conductas diferentes comparadas con los animales con menos neuronas. Además encontramos un correlato significativo entre el número de neuronas inmaduras y la realización de la tarea conductual (Gradari, Perez-Domper et al. 2014). Los resultados de nuestro grupo incitan a cambiar el modo de estudio de la AHN y las tareas relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Creemos necesario evaluar los efectos conductuales de las alteraciones en la AHN, no como proceso único, sino como el cómputo de poblaciones en diferentes estados de maduración, con características electrofisiológicas especiales, que pueden individualmente tener un papel funcional en el desarrollo de la tarea.

2.5.2 Implicación funcional de la AHN en depresión.

El papel de la neurogénesis hipocampal en el mantenimiento del estado del ánimo y en especial de la depresión resulta controvertido. Hace aproximadamente una década surgió la hipótesis neurogénica de la depresión cuyos postulados principales son: una disminución de la AHN genera depresión y ansiedad y un tratamiento efectivo con antidepresivos necesita tener la AHN intacta.

Estos resultados estaban respaldados con trabajos de los años 90 que demostraron que el estrés incrementa la muerte neuronal (Gould, Woolley et al. 1991) y que la deplección de 5-HT inhibe la AHN (Brezun and Daszuta 1999). Poco tiempo después se

describió que el tratamiento crónico, y no el agudo, con antidepresivos incrementaba la proliferación y la supervivencia estaban incrementadas por el tratamiento con antidepresivos (Malberg, Eisch et al. 2000). El efecto proneurogénico de los antidepresivos ha sido corroborado por numerosos autores (Manev, Uz et al. 2001, Santarelli, Saxe et al. 2003, Kodama, Fujioka et al. 2004, Encinas, Vaahrokari et al. 2006, Huang and Herbert 2006, Marcussen, Flagstad et al. 2008).

A finales de los 90, además se demostró la AHN en humanos (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). También por esas fechas comenzaron los estudios en modelos murinos que demostraban que las nuevas neuronas se integraban funcionalmente en el circuito (Hastings and Gould 1999, Markakis and Gage 1999, van Praag, Schinder et al. 2002).

El primer postulado se evaluó bloqueando la neurogénesis mediante irradiación, con la droga antimetabólica MAM o con modelos genéticos que tenían abolida parcialmente la AHN. La mayoría de estos estudios concluyó que la ablación no inducía un efecto depresivo y/o ansioso (Santarelli, Saxe et al. 2003, Meshi, Drew et al. 2006, Holick, Lee et al. 2008, Surget, Saxe et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Revest, Dupret et al. 2009, Snyder, Soumier et al. 2011). Los resultados parecían indicar que una deficiencia neurogénica no era la etiología de la depresión.

El segundo postulado afirma que es necesaria una neurogénesis intacta para la acción antidepresiva eficiente de los antidepresivos. Para este postulado se ha realizado dos tipos de estudios, un primer grupo de trabajos en los que se evalúa el efecto del tratamiento antidepresivo en animales no-estresados con depleción neurogénica y un segundo grupo de trabajos que evalúa la eficacia antidepresiva en modelos animales de depresión con depleción neurogénica.

El primer grupo de trabajos parecen indicar que los efectos conductuales del tratamiento antidepresivo están negativamente afectados por la eliminación de la AHN (Santarelli, Saxe et al. 2003, Jiang, Zhang et al. 2005, Wang, David et al. 2008) (Airan, Meltzer et al. 2007). Sin embargo hay que tener en cuenta que en la práctica clínica el uso de antidepresivos no se toma de manera preventiva, sino una vez es diagnosticado el síndrome.

En el segundo grupo de trabajos se evalúa la eficacia antidepressiva en modelos animales de depresión con depleción neurogénica. Estos trabajos están basados en observaciones realizadas en tejido *post-mortem* humano que han indicado que pacientes depresivos tratados con antidepressivos muestran un incremento de células en ciclo (Boldrini, Underwood et al. 2009). Se han utilizado varios modelos de depresión y los resultados resultan altamente contradictorios, divergiendo los resultados en función de la prueba utilizada para evaluar la conducta depresiva o el fármaco utilizado (Santarelli, Saxe et al. 2003, Bessa, Ferreira et al. 2009, David, Samuels et al. 2009, Surget, Wang et al. 2009, Surget, Tanti et al. 2011). Recientemente se ha publicado un trabajo que evalúa la eficacia antidepressiva en la recuperación, tras una inducción del estado depresivo, y ha mostrado que es necesaria la AHN intacta para que los fármacos puedan ejercer sus efectos terapéuticos (Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013).

Si el escenario de por sí ya parece complejo hay que sumar que se ha descrito consistentemente una disociación funcional a lo largo del eje septo-temporal (figura 11). En roedores la región ventral parece estar preferentemente relacionada con conductas relacionadas con la ansiedad (Kjelstrup, Tuvnes et al. 2002, Degroot and Treit 2004, McHugh, Deacon et al. 2004, Trivedi and Coover 2004, Pentkowski, Blanchard et al. 2006, Hunsaker and Kesner 2008). Esta regionalización dorso/ventral ha sido confirmada utilizando la amperometría de oxígeno en tejido cerebral, ya que la región dorsal ha sido asociada aprendizaje espacial y la ventral a conductas relacionadas con la ansiedad (McHugh, Fillenz et al. 2011). Aunque está menos documentada, también se ha descrito una separación funcional entre el hipocampo anterior y posterior humano (Poppenk, Evensmoen et al. 2013).

Aunque existen ciertas discrepancias, varios autores han descrito alteraciones de la AHN específicamente en la región ventral de animales en diferentes modelos de comportamiento depresivo y/o MDD (del inglés, Major Depressive Disorder) (Jayatissa, Bisgaard et al. 2006, Brummelte and Galea 2010, Elizalde, Garcia-Garcia et al. 2010, Oomen, Soeters et al. 2010, Morley-Fletcher, Mairesse et al. 2011, Hawley and Leasure 2012, Tanti, Rainer et al. 2012, Diniz, dos Santos et al. 2013, Tanti, Westphal et al. 2013).

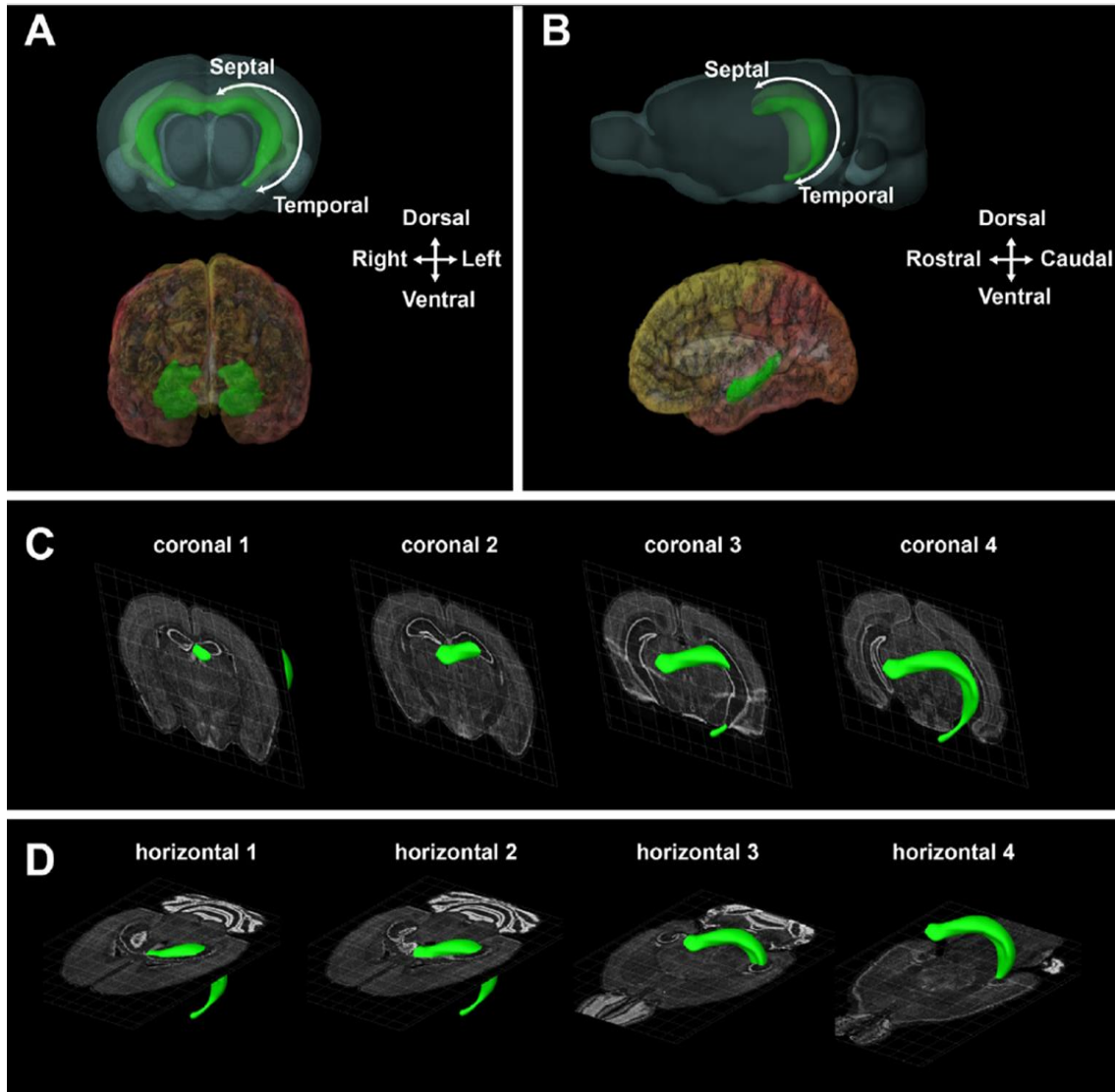


Figura 11: Orientación del hipocampo en el cerebro de ratón y humano. (A-B) Visiones coronales y sagitales de la formación hipocampal de ratón (carril superior) y de humano (carril inferior). La formación hipocampal se representa en verde. **(C-D)** Cortes coronales y horizontales respectivamente de la formación hipocampal. (Tanti and Belzung 2013).

3. La depresión

3.1 Aspectos generales

Aunque sabemos de la existencia de los trastornos del ánimo desde el siglo cuarto a.C. su etiología sigue siendo razón de debate. Cada vez tenemos más evidencias que manifiestan que la depresión está lejos de ser una patología con una manifestación fisiopatológica, sino un síndrome complejo que involucra el organismo entero y cuyo diagnóstico está basado en síntomas heterogéneos.

La depresión es un síndrome común cuya prevalencia está incrementando. La organización mundial de la salud (OMS) estima que para el año 2020 la depresión mayor sea la segunda causa de discapacidad laboral. Las consecuencias económicas de la depresión se han estimado en 83 billones de dólares en Estados Unidos y 118 millones de euros en Europa (Sobocki, Jonsson et al. 2006, Donohue and Pincus 2007).

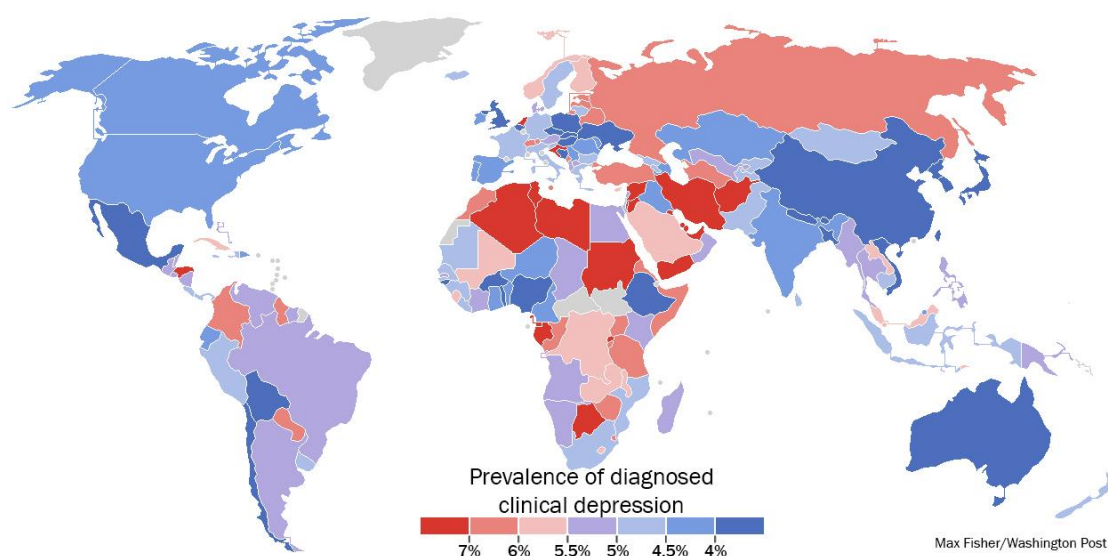


Figura 12: Mapa de prevalencia de la depresión mundial. Realizado basado en el estudio de Ferrari et al (Ferrari, Charlson et al. 2013).

Aunque las cifras de prevalencia varían en función del estudio, la OMS estima que en el mundo hay más de 350 millones de personas con depresión, entorno al 4% de la población mundial (figura 12). Siendo la prevalencia casi el doble en mujeres. En España se estima que hay entre 1.200.000 y 1.500.000 enfermos con depresión (Padín, Lozano et al. 2001).

La depresión es un síndrome que engloba un conjunto de síntomas muy heterogéneos. Los principales tipos de depresión son: el trastorno depresivo mayor (MDD), el trastorno distímico, la depresión psicótica, la depresión posparto, el trastorno afectivo estacional y la depresión bipolar, siendo los dos primeros las formas más comunes (NIH).

La MDD también se denomina depresión unipolar o depresión clínica. Se da cuando un paciente tiene uno o más episodios depresivos mayores. Los criterios que establecen tanto el DSM-IV como el CIE-10 para el trastorno depresivo mayor son la presencia durante al menos dos semanas de por lo menos cinco de los síntomas siguientes:

- Estado de ánimo triste, disfórico o irritable durante la mayor parte del día y durante la mayor parte de los días.
- Anhedonia o disminución de la capacidad para disfrutar o mostrar interés y/o placer en las actividades habituales.
- Disminución o aumento del peso o del apetito.
- Insomnio o hipersomnio.
- Enlentecimiento o agitación psicomotriz.
- Astenia.
- Sentimientos recurrentes de inutilidad o culpa.
- Disminución de la capacidad intelectual.
- Y por último pensamientos recurrentes de muerte o ideas suicidas.

El trastorno distímico es un trastorno afectivo de carácter depresivo crónico, caracterizado por la baja autoestima y aparición de un estado de ánimo melancólico, triste y apesadumbrado, pero que no cumple con todos los patrones diagnósticos de la MDD.

La depresión psicótica que ocurre cuando la MDD va acompañada por alguna forma de psicosis.

La depresión posparto, la cual se diagnostica si una mujer ha dado a luz recientemente. Se calcula que entre el 10 y el 15 por ciento de las mujeres que dan a luz sufren esta enfermedad (Altshuler, Hendrick et al. 1998).

El trastorno afectivo estacional tiene los mismos síntomas que el trastorno depresivo mayor, en lo que difiere es que se produce en una época del año, suele ser el invierno.

La depresión bipolar es la fase depresiva de un trastorno llamado trastorno Bipolar (enfermedad maniaco-depresiva).

3.2 Etiología de la depresión.

La etiología de la depresión sigue siendo a día de hoy desconocida, sin embargo se piensa que es un modelo de interacción genética-ambiente. Se han descrito varios polimorfismos involucrados en el desarrollo de la depresión, entre ellos están los genes de los transportadores 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2A, el receptor de endocannabinoides CB1, la enzima triptófano hidroxilasa, CREB1 y BDNF entre otros (Bagdy, Juhasz et al. 2012). El factor ambiental está principalmente marcado por diferentes situaciones que suponen un estrés para el individuo. Los factores de riesgo del episodio depresivo son: estar separado/divorciado, historia familiar con abuso de alcohol o depresión, pérdidas parentales en la infancia, parto en los 6 meses precedentes, un contexto ambiental conflictivo o los acontecimientos vitales desfavorables entre otros.

La depresión puede aparecer de manera espontánea o asociada a otras patologías de origen neurológico, como el infarto, la esclerosis múltiple o el Parkinson, o endocrino, como el hipotiroidismo o el síndrome de Cushing.

3.3 Neurobiología de la depresión.

Múltiples trabajos han demostrado alteraciones estructurales y funcionales en pacientes depresivos. Sin embargo aún no está claro si estas alteraciones son etiológicas e inducen a la depresión o si por lo contrario son consecuencia de ésta (Aan het Rot, Mathew et al. 2009).

3.3.1 Neurotransmisores

El modelo clásico está basado en las alteraciones de los 3 sistemas de monoaminas- serotonina (5-HT), noradrenalina (NE) y dopamina (DA) (Krishnan 2014). Los avances en neurobiología y las mejoras en los sistemas de análisis de imagen funcional han avalado el papel de estos sistemas en la patología. Sin embargo actualmente también se ha visto involucrado el neurotransmisor GABA y el glutamato (Krishnan 2014).

3.3.1.1 Alteraciones en el sistema serotoninérgico.

Numerosos estudios han avalado el papel del sistema serotoninérgico en la depresión. Se ha descrito una disminución de la concentración de 5-HT en el líquido cefalorraquídeo de pacientes depresivos que se han suicidado (Mann, Malone et al. 1996). Estudios de tomografía de emisión de positrones han revelado una disminución de la densidad de sitios de unión en los transportadores de serotonina en plaquetas y cerebro medio de pacientes depresivos (Drevets, Frank et al. 1999). Estudios previos habían demostrado un incremento de la densidad de los receptores 5HT2 en plaquetas y cerebro de pacientes depresivos. Se hipotetiza que este incremento es un mecanismo compensatorio para responder a los niveles bajos de 5-HT. Se ha descrito el papel de la depleción del triptófano en el mecanismo de actuación de los antidepresivos, es más se ha descrito una disminución en el plasma del L-triptófano, precursor de la 5-HT en pacientes depresivos (Delgado, Miller et al. 1999).

3.3.1.2 Alteraciones en el sistema noradrenergico.

Estudios neuroquímicos y neuroendocrinos han confirmado el papel de este sistema en la patología depresiva. Según la Sociedad Americana de Psiquiatría las principales alteraciones son: Niveles bajos de los metabolitos de la NE en orina y

líquido cefaloraquídeo de pacientes depresivos. Un incremento de la densidad de los receptores β -adrenergicos en tejido cortical *post mortem* de pacientes depresivos suicidas. El estrés, principal inductor de la depresión en individuos vulnerables, incrementa la actividad de los circuitos noradrenérgicos en el cerebro. Un incremento de la actividad de la MAO-A en el sistema nervioso central de pacientes depresivos. Los inhibidores de la recaptación de la NE son antidepresivos efectivos. Pacientes tratados con inhibidores de los recaptadores de NE y que posteriormente se les retira el tratamiento farmacológico presentan una reactivación de los síntomas depresivos.

3.3.1.3 Alteraciones en el sistema dopaminérgico.

Aunque clásicamente este sistema se ha visto implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia, actualmente varios investigadores han evidenciado su papel en el síndrome depresivo. Según la Sociedad Americana de Psiquiatría las principales alteraciones son: la depresión como causa secundaria de la enfermedad de Parkinson, estando ésta caracterizada por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Estudios de neuroimagen y estudios en tejido *post mortem* han demostrado una reducción en la neurotrasmisión de DA. Se ha reportado una disminución de los metabolitos de DA en el líquido cefaloraquídeo de pacientes depresivos. Un incremento de la actividad de la MAO-A en el sistema nervioso central de pacientes depresivos. Fármacos que inducen un incremento de la neurotrasmisión dopaminérgica han mostrado tener propiedades antidepresivas.

3.3.1.4 Alteraciones en GABA y glutamato.

Numerosos estudios han implicado a GABA y al glutamato en la fisiopatología de la depresión. Se han detectado niveles elevados de GABA en la corteza occipital de pacientes con MDD (Sanacora, Mason et al. 1999). Se han detectado reducciones anormales de las concentraciones de glutamato/glutamina y GABA en la corteza prefrontal de pacientes depresivos no medicados (Hasler, van der Veen et al. 2007). También se han detectado alteraciones en los receptores de glutamato y GABA de pacientes depresivos en relación con los sujetos controles (Choudary, Molnar et al. 2005).

3.3.2 Estrés y depresión, hipótesis de la cascada de glucocorticoides

Estudios clínicos han demostrado la hiperactividad del HPA y unos elevados niveles de cortisol en pacientes diagnosticados con MDD (Plotsky, Owens et al. 1998, Parker, Schatzberg et al. 2003), y el tratamiento con antidepresivos se asocia con una normalización de la actividad del eje HPA (Sallee, Nesbitt et al. 1995).

Como se explicó previamente, la activación del eje HPA induce en último lugar la liberación de GCs. Estos ayudan a mantener los niveles de glucocorticoides a niveles fisiológicos. El eje HPA responde a estrés, existiendo una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino.

En humanos se ha descrito una expresión abundante de GRs en el GD y CA1 de la formación hipocampal y en menor medida en CA3. Los GRs se expresan principalmente en astrocitos y su expresión es estable con la edad. Se ha visto un aumento de los GRs en el hipocampo y la amígdala de pacientes con MDD (Wang, Joels et al. 2012, Wang, Van Heerikhuize et al. 2013, Wang, Verweij et al. 2013).

La hipótesis de la cascada de los glucocorticoides propone que el daño hipocampal visto en paciente depresivos alteraría la respuesta a los glucocorticoides, desinhibiendo la actividad de la CRH, incrementando la actividad del eje HPA en un sistema de retroalimentación positiva. Aunque la hipótesis de la cascada de los glucocorticoides se propuso como mecanismo patogénico de la depresión, actualmente hay varios detractores de esta teoría (Lucassen, Pruessner et al. 2014).

3.3.3 Hipótesis neurogénica de la depresión.

Está descrito que pacientes con MDD tiene un volumen hipocampal menor (Lupien, Evans et al. 2007, Pruessner, Dedovic et al. 2010, Ahdidan, Hviid et al. 2011, Lucassen, Pruessner et al. 2014). La hipótesis neurogénica de la depresión propone que una reducción prolongada de la neurogénesis, producida por el estrés, puede afectar a la estructura y volumen hipocampal en la MDD. Además un tratamiento antidepresivo efectivo requiere aumentar la tasa neurogénica. Sin embargo, actualmente se piensa que más que contribuir a la etiología de la depresión, contribuye al mecanismo de

acción de los fármacos antidepresivos (Petrik, Lagace et al. 2012, Lucassen, Pruessner et al. 2014).

3.4 Tratamientos antidepresivos.

Los antidepresivos son medicamentos que alivian los síntomas de la depresión. Actualmente en el mercado español hay en torno a 30 fármacos diferentes y estos pueden clasificarse en cuatro tipos básicos: los ISRSs (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina), los IRSNs (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina, los antidepresivos tricíclicos y los IMAOs (Inhibidores de la Monoaminoxidasa). Siendo los dos primeros los más utilizados actualmente en la práctica clínica.

Sin embargo solo un intervalo de entre el 50 y el 70 por ciento responde de manera efectiva al tratamiento (Morilak and Frazer 2004). El tardío efecto terapéutico y los efectos adversos conllevan en muchos casos una falta de adherencia en el tratamiento. Se requiere un tiempo de entre 4 y 6 semanas de tratamiento para empezar a percibir su efecto terapéutico. Aun así entre el 25 y el 35 por ciento de los pacientes responden al tratamiento tras 6 semanas de administración (Schlaepfer and Bewernick 2014). Aunque se han estado analizando otras dianas farmacológicas, ninguna ha resultado ser la solución a esta patología.

4. Sumario de los antecedentes.

Considerando que:

- Los tratamientos farmacológicos actuales contra la depresión aún inducen efectos secundarios no deseados, además no son plenamente eficaces dándose efectos placebo en muchos casos, y que la prevalencia esperable de la enfermedad va a incrementar en un futuro (OMS).
- Numerosos trabajos han reportado que, los fármacos antidepresivos más eficaces utilizados actualmente, requieren de una neurogénesis hipocampal adulta intacta cuando se testa en modelos animales. Además se ha descrito una modulación de la actividad de la GSK-3 por estos mismo antidepresivos (fluoxetina e imipramina).
- La neurogénesis hipocampal adulta está involucrada en los procesos de cognición y depresión, incluidos seres humanos (como se ha puesto de manifiesto en estudios post-mortem).
- La inhibición de GSK-3 a través de *Wnt* o de factores de crecimiento, está relacionada con neurogénesis, así como esta neurogénesis está relacionada con fenómenos de depresión y cognición.
- GSK-3 está relacionada con la depresión y modula neurogénesis y plasticidad neural.

De acorde con los puntos previamente expuesto hemos planteado la presente Tesis en los términos de las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Los análisis de los efectos conductuales y neurogénicos de un nuevo inhibidor de GSK-3 pueden revelar una acción eficaz a la hora de aumentar la tasa neurogénica hipocampal de modo que ejerza efectos antidepresivos y no otros efectos cognitivos colaterales.
2. Los efectos pueden ser específicos del estado de ánimo y no para otros efectos cognitivos colaterales, específico de las regiones cerebrales implicadas en estos

procesos, y específicos de determinadas subpoblaciones neurogénicas, todo ello de acuerdo con la teoría actual neurogénica de la depresión y de la hipótesis de la inmadurez funcional útil de la neurogénesis hipocampal adulta.

Para testar estas hipótesis, proponemos los Objetivos descritos a continuación.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es estudiar el efecto del fármaco VP2.51, inhibidor de la GSK-3, en la neurogénesis hipocampal adulta y sus posibles efectos en conductas hipocampo dependientes, centrándonos en su efecto antidepresivo.

Los objetivos específicos fueron:

1. Efecto crónico del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.
2. Efecto crónico del VP2.51 en conductas relacionadas con la función hipocampal. Validez predictiva del fármaco
3. Efecto terapéutico del VP2.51 en la conducta depresiva.
4. Efecto crónico del VP2.51 en un modelo de depresión mayor. Comparativa con la fluoxetina.
5. Efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados crónicamente con el inhibidor VP2.51.
6. Mecanismo de actuación del fármaco VP2.51.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Para todos los estudios se utilizaron ratones C57/BL6J machos de 7-8 semanas de edad proporcionados por la empresa Harlan Laboratories. Los ratones se mantuvieron en el animalario del Instituto Cajal en salas con una temperatura controlada (22-24°C) y con ciclos alternativos de 12 horas de luz/oscuridad (encendido a las 7:00 y apagado a las 19:00). Se estabularon en grupos de 5 ratones en cubetas de 530cm² enriquecidas con material de anidamiento. Antes de comenzar cualquier procedimiento experimental se dejó un tiempo de habituación de una semana. Los animales se sometieron a control veterinario siguiendo las normas de la Unión Europea (86/609/EEC). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la institución.

Se utilizaron animales controles, vehículo, tratados con VP2.51 y fluoxetina durante tiempos variables.

1.1 Tratamientos crónicos farmacológicos.

El fármaco VP2.51 se obtuvo en estado sólido del Laboratorio de la Dra. Ana Martínez en el Instituto de Química Médica del CSIC y se almacenó a temperatura ambiente hasta su disolución.

La dilución del fármaco se calculó teniendo en cuenta el peso final aproximado que tendrían los ratones al terminar el experimento y teniendo en cuenta el volumen máximo de inyección.

Como se puede observar en la figura 13, los ratones de 7-8 semanas pesan alrededor de 22-23 gr y pueden llegar a pesar 30 gr en 4-5 semanas. Por esta razón se calculó los mg de fármaco necesarios para una dosis de 2,5mg/Kg en ratones de un peso medio de 30 gr.

$$30 \text{ gr} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ gr}} \times \frac{2,5 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} = 0,075 \text{ mg de VP2.51 por cada 30 gr de ratón.}$$

Con el fin de no dañar el tejido peritoneal se calculó un volumen máximo de inyección de 200 µL.

$$\frac{0,075 \text{ mg}}{200 \text{ } \mu\text{L}} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 0.375 \text{ mg VP2.51/ml}$$

Debido a la baja solubilidad del fármaco en medio acuoso se disolvió en 50% Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma, D2650) y 50% Tween-80 (Merk, 822187) a una concentración 3,75 mg/ml de manera que la disolución madre estuviera 10 veces más concentrada (10X).

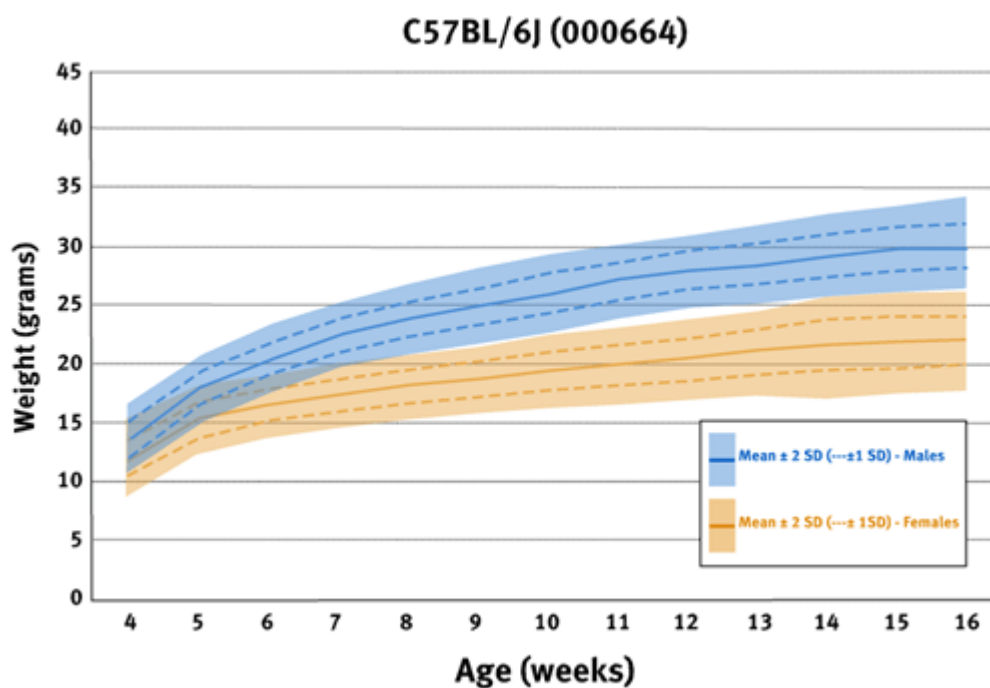


Figura 13: Evolución del peso normal de la cepa de ratones C57/BL6J en el tiempo y separados por sexos. Fuente: The Jacksons Laboratory

Para los grupos experimentales vehículo se preparó una solución madre de 50% DMSO 50% Tween-80. Diariamente se preparó el fármaco y el vehículo disolviendo 1:10 la solución madre en salino al 0,9% en volumen. Los animales tratados con VP2.51 se inyectaron a una dosis final de 2,5 mg/kg en 5% DMSO/5% Tween-80/Salino al 0,9%

en volumen y los controles el vehículo (5% DMSO/5% Tween-80/Salino al 0,9% en volumen).

Se utilizó la fluoxetina (Sigma, F132), un antidepresivo comercial, para comparar la eficacia antidepresiva del VP2.51 en el modelo de depresión del UCMS (del inglés, unpredictable chronic mild stress). La dosis de administración fue 10 mg/kg en salino 0,9%. De la misma forma que con el VP2.51, se calculó la dilución del fármaco en base al peso final aproximado que tendrían los ratones al final del experimento. Diariamente se pesó la fluoxetina y se disolvió en salino al 0,9%.

Se elaboró una tabla para calcular los volúmenes de inyección en función del peso específico de cada ratón (tabla 1). El seguimiento de los pesos se realizó semanalmente.

Pesos (gr)	Volumen inyección (μL)
21	140
22	147
23	153
24	160
25	167
26	173
27	180
28	187
29	193
30	200
31	207
32	213

Tabla 1: Volumen de inyección en función del peso específico de cada ratón.

La administración del vehículo, VP2.51 y fluoxetina en animales adultos jóvenes se realizó mediante una inyección intraperitoneal diaria (de lunes a viernes) durante un

periodo mínimo de 2 semanas (Figura 13). Durante las evaluaciones conductuales se inyectó 30 min antes de comenzar la prueba conductual.

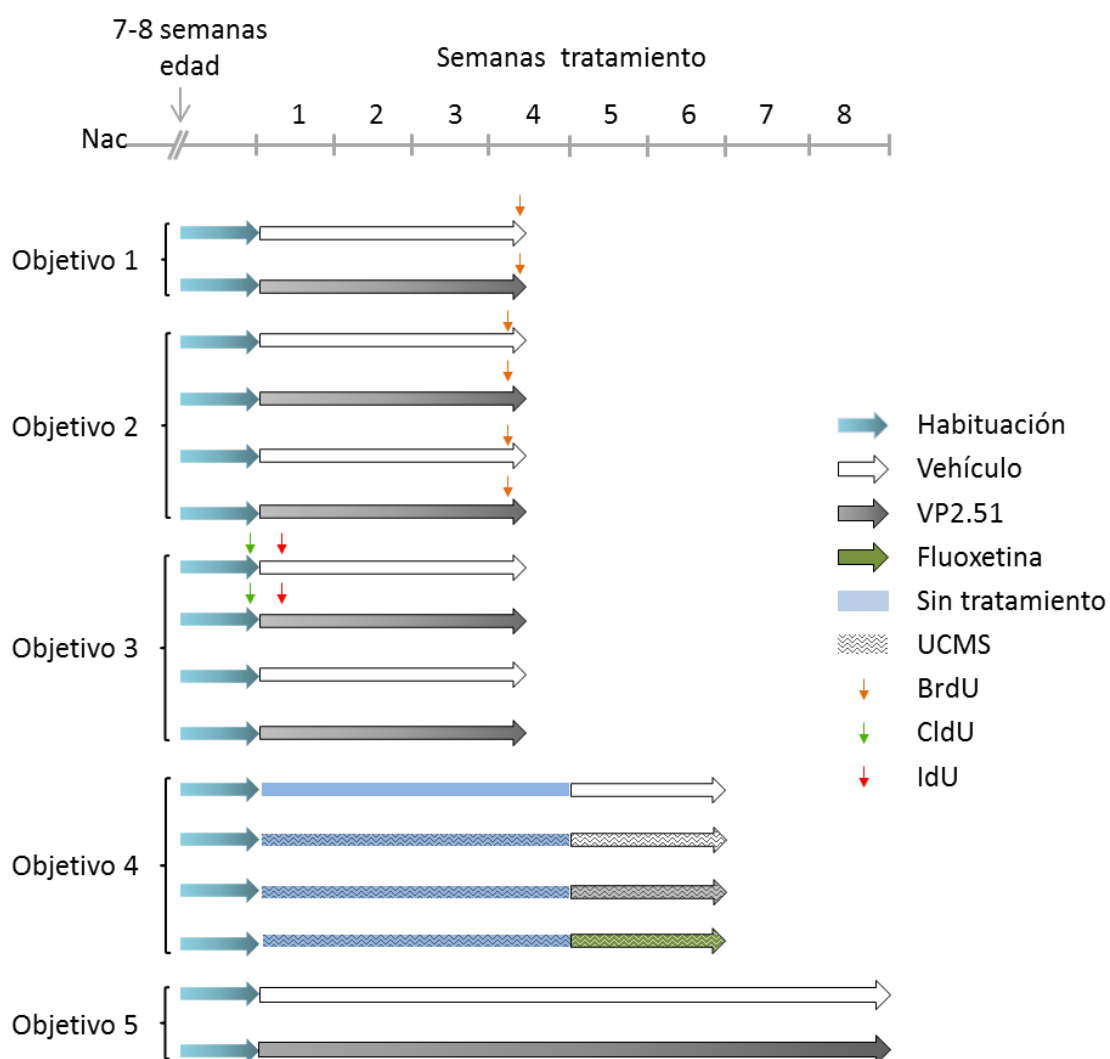


Figura 13: Diseño experimental de los grupos experimentales tratados crónicamente. Las flechas azules representan la semana de habituación, en blanco los ratones tratados con vehículo, en gris los ratones tratados con el VP2.51 a una dosis de 2,5 mg/kg y en verde ratones tratados con Fluoxetina a una dosis de 10 mg/kg. Los cuadrados azules representan periodos en los que los animales no fueron inyectados con ningún compuesto. Las regiones con trama ondulada representan los ratones que se expusieron a un UCMS. Las flechas indican las inyecciones con los análogos de la timidina. En naranja la BrdU, en verde la CldU y en roja la IdU.

Todos los grupos experimentales tienen una N=10, a excepción de objetivo 1, en el que el grupo VP2 tiene una N=8 ratones y el grupo vehículo una N=6 ratones.

1.2 Tratamiento agudo con el inhibidor de GSK3 VP2.51.

Para estudiar el efecto inhibitorio agudo del fármaco sobre la GSK3 en tejido cerebral de ratón se realizó un estudio en el que se inyectó el fármaco 30 min (N=4), 60 min (N=4), 6h (N=3) y 24h (N=3) antes del sacrificio. Se inyectó el vehículo a los 30 min (N=3) y 6h (N=3) antes del sacrificio (figura).

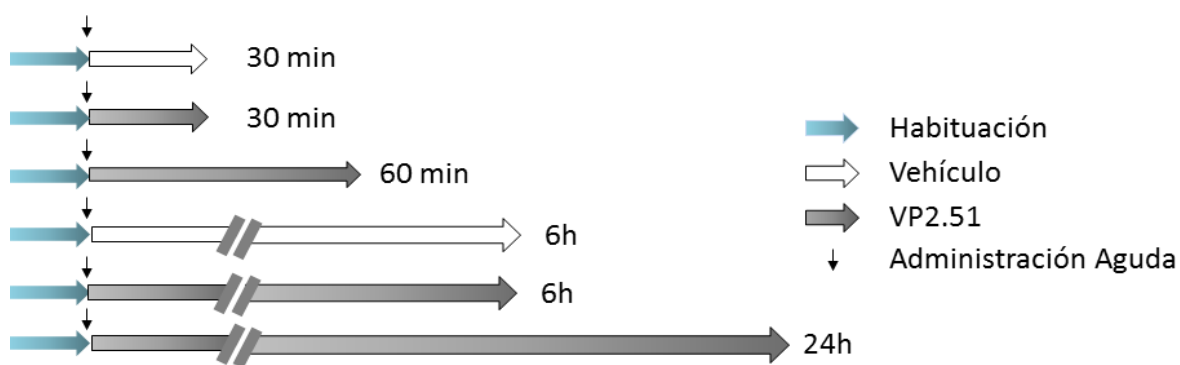


Figura: Grupos experimentales con tratamiento agudo. El periodo de habituación se representa en azul, los grupos tratados con VP2.51 en gris, y los controles en blanco. Las flechas negras indican la inyección de fármaco/vehículo.

1.3 Análogos de timidina.

Los análogos de timidina son nucleótidos sintéticos que por su homología permiten una sustitución casi total durante la fase de replicación del ADN en la proliferación celular. Estos compuestos pueden ser posteriormente detectados por técnicas inmunohistoquímicas. Mediante esta técnica podemos hacer estudios de proliferación y supervivencia.

1.3.1 Estudios de proliferación.

Para estudiar el efecto del fármaco en la proliferación de la zona subgranular (SGZ) de la formación hipocampal se utilizó la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Sigma, B5002). Se inyectó intraperitonealmente una única dosis de 50 mg/kg a las 24 horas (objetivo 1) y 48 horas (objetivo 2) antes del sacrificio (véase figura 13).

A partir del peso medio del grupo se calculó la cantidad de BrdU necesaria para inyectar una dosis de 50 mg/kg. Se determinó como volumen máximo de inyección 200 µl por ratón. La BrdU necesaria se pesó en una balanza de precisión y se le añadió el volumen correspondiente de solución salina. Se dio un golpe de calor en el microondas para disolverlo. En este proceso se evitó que el salino llegase a hervir. Generalmente un único golpe de calor fue necesario para disolver la BrdU completamente. Inmediatamente después se procedió a la inyección. En función del peso específico de cada ratón se recalculó el volumen exacto de inyección para obtener una dosis final de 50 mg/kg (véase tabla 1).

1.3.2 Estudios de la recuperación proliferativa/supervivencia tras una prueba de natación forzada (Porsolt).

La 5-cloro-2'-desoxiuridina (CldU) y la 5-iodo-2'-desoxiuridina (IdU), a diferencia de la BrdU, permiten en un mismo grupo experimental detectar células en división en dos fechas experimentales diferentes. Los análogos se utilizaron en los grupos experimentales de objetivo 3. La CldU se inyectó 24h antes de la prueba de natación forzada (véase apartado de material y métodos 2.2 Prueba de natación forzada) y la IdU 48 h después de la sesión del segundo día.

La CldU e IdU se administraron en concentraciones equimolares a la BrdU. La CldU se inyectó a una dosis de 42,75 mg/kg disuelto en Salino 0,9% y la IdU a una dosis de 57,65 mg/kg disuelto en PBS. El proceso de preparación de la CldU es idéntico al de la BrdU. Debido a la insolubilidad de la IdU, se disolvió en PBS con par de microlitros de NaOH 1N. De nuevo se procedió a la inyección inmediatamente después de preparar los compuestos. Para evitar la precipitación del producto disuelto, se vigiló que no transcurriera nunca más de 30 min desde la disolución de la IdU y la inyección intraperitoneal.

1.4 Sacrificio y obtención del tejido.

Todos los grupos experimentales a excepción de objetivo 4 se sacrificaron con una dosis letal de anestésico eutanásico. Los animales se anestesiaron profundamente con Pentobarbital 10 mg/kg (Euta-Lender, N°0555 ESP) inyectado intraperitonealmente. Todos los animales fueron perfundidos transcardiacamente con solución salina al 0,9% con el fin de eliminar todos los componentes sanguíneos.

Los animales destinados a los estudios histológicos (objetivo 1) y los grupos inyectados con los análogos de timidina de objetivo 3) fueron seguidamente perfundidos con la solución fijadora, paraformaldehído (PFA) al 4% en Tampón fosfato (PB) 0,1N. Posteriormente se decapitaron y extrajeron, con extrema delicadeza, los cerebros y se dejaron durante la noche en PFA al 4% en agitación y a temperatura ambiente.

Los animales, destinados a estudios bioquímicos (tratamiento agudo) o destinados a estudios bioquímicos y de histología (objetivo 2, objetivo 3, objetivo 4), tras la perfusión con salino se decapitaron y posteriormente se extrajeron los cerebros sobre una placa de hielo. Los cerebros del experimento agudo se diseccionaron y se obtuvieron muestras de cerebelo, corteza prefrontal medial y de la formación hipocampal. Los cerebros de objetivo 2, objetivo 3 y objetivo 4 se dividieron en hemisferios: hemisferio izquierdo (HI) y hemisferio derecho (HD). En objetivo 2 y 3 el HI se diseccionó y se obtuvieron muestras de cerebelo, corteza y de la formación hipocampal. En objetivo 4 el HI se diseccionó y se obtuvieron muestras de cerebelo, corteza prefrontal medial y de la formación hipocampal; cada muestra de corteza prefrontal medial y formación hipocampal se homogenizó con ayuda de un bisturí y se dividió en dos partes. Una se destinó a estudios de Western Blot (WB) y la otra a estudios con la técnica de la PCR cuantitativa. A continuación todas las muestras se introdujeron en nieve carbónica y posteriormente se guardaron en un ultracongelador a -80°C. Los HDs de objetivos 2, 3 y 5 se fijaron por inmersión en PFA al 4% durante 24h en agitación a temperatura ambiente. A continuación se detalla una tabla en la que se esquematiza el procedimiento de perfusión, fijación y uso de los hemisferios (tabla 2).

Experimento	Perfusión Transcardiaca	Fijación	Hemisferio Derecho	Hemisferio Izquierdo
Objetivo 1	Salino 0,9% + PFA 4%	Transcardiaca	Histología	Histología
Objetivo 2	Salino 0,9%	Inmersión	Histología	Estudios Bioquímicos
Objetivo 3	Salino 0,9%	Inmersión	Histología	Estudios Bioquímicos
Objetivo 4	Salino 0,9%	Inmersión	Histología	Estudios Bioquímicos
Experimento Agudo	Salino 0,9%	Inmersión	Estudios Bioquímicos	Estudios Bioquímicos

Tabla 2: Resumen del procedimiento de perfusión, fijación y uso de los hemisferios.

2. Estudios de comportamiento y memoria.

Los estudios conductuales de los animales comenzaron en todos los casos con una habituación a la sala de unos 30 min de duración y, posteriormente, se inyectó el tratamiento farmacológico (vehículo, VP2.51 y fluoxetina en el experimento de objetivo 4). La prueba comenzó 30 min después de la administración. Se alternaron los animales de las diferentes condiciones experimentales en la realización de las pruebas. En todas las pruebas comportamentales se mantuvo constante la intensidad lumínica y el experimentador se mantuvo fuera del alcance visual de los animales que estaban realizando la prueba.

2.1 Prueba del Laberinto en Cruz (EPM, del inglés *Elevated Plus Maze*).

El laberinto en cruz ha sido descrito como un método simple para evaluar la ansiedad en roedores (Lister 1987).

2.1.1 Desarrollo de la prueba.

El laberinto está formado por dos brazos cerrados y dos brazos abiertos; en éstos últimos el animal puede detectar el nivel elevado en el que se encuentra a 40 cm.

Esta prueba se realizó en una única sesión de 5 minutos en la que se colocó al animal en el centro del laberinto, con la cabeza hacia los brazos abiertos y en dirección opuesta al experimentador. En cada ensayo se dejó al ratón moverse libremente en todo el aparato. En caso de que se hubiera caído el ratón durante el ensayo, en la primera caída, el experimentador lo colocó de nuevo en la zona central. En caso de posteriores caídas el animal sería descartado. Ningún animal tuvo que ser descartado. Tras la finalización de la prueba se devolvió al ratón a su cubeta y se limpió bien la superficie del laberinto.

2.1.2 Evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad.

Los movimientos de los animales fueron grabados por el programa video Tracking Interface y analizados con el programa Video Maze (figura 14).

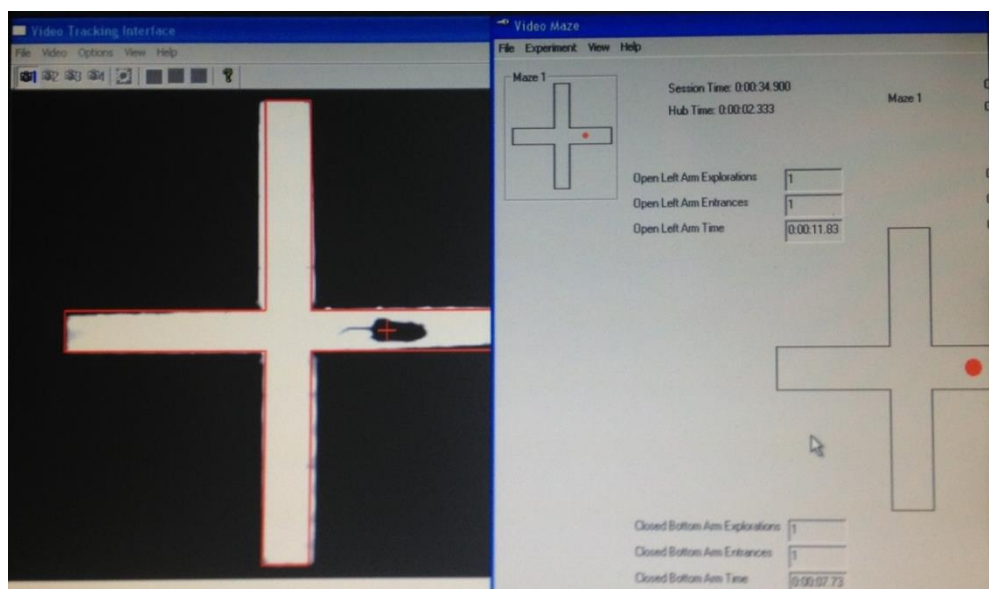


Figura 14: Foto representativa de la grabación y análisis con el programa video Tracking Interface (izquierda) y el programa Video Maze (derecha).

Los resultados son presentados como el tiempo total en los brazos abiertos, tiempo total en brazos cerrados y tiempo total en la zona central. También se evaluó el número de exploraciones en los brazos abiertos (cuántas veces se asomó a los brazos

abiertos) y el número de entradas en los brazos abiertos (cuántas veces salió el animal por completo a los brazos abiertos).

Si algún animal hubiese quedado en *freezing* durante un tiempo mayor a 100 s, se hubiera considerado anómalo y se hubiera excluido del análisis de datos, sin embargo en nuestros grupos experimentales no fue necesario excluir ningún animal.

2.2 Prueba de la natación forzada (FST, del inglés *Forced Swimming Test*).

El FST es un paradigma clásico de desesperanza aprendida. Esta prueba la utilizamos con dos objetivos experimentales. El primer objetivo es evaluar la eficacia de un fármaco antidepresivo. El segundo objetivo va es inducir mediante estrés agudo muy fuerte un comportamiento depresivo y/o ansioso (véase más al respecto en discusión). En esta prueba los ratones son forzados a nadar en un cilindro del cual no pueden escapar. Esta condición lleva a un estado de desesperanza aprendida, es decir se resignan a las condiciones experimentales sin intentar escapar (inmovilidad). Esta misma condición nos sirve para testar la eficacia antidepresiva de un fármaco: cuanto más efectivo sea el antidepresivo, menos van a tender a resignarse a la condición experimental y se observará una disminución del tiempo de inmovilidad (Porsolt, Bertin et al. 1977, Porsolt, Le Pichon et al. 1977).

2.2.1 Desarrollo de la prueba.

Los animales fueron introducidos de dos en dos en dos cilindros de metacrilato, separados por una cartulina negra y lleno de agua a una temperatura de 23°C. Para el objetivo de medir la eficacia antidepresiva se realizaron dos protocolos, ambos de 6 minutos de duración. En objetivo 2 se realizó un protocolo de 2 sesiones con una diferencia horaria de 24 horas y en objetivo 4 se utilizó un protocolo de una única sesión. Con el objetivo de inducir un comportamiento depresivo en objetivo 3, se realizaron dos sesiones con una diferencia horaria de 24h y una duración de 10 minutos. La altura del agua fue de unos 15 cm, de manera que el ratón no tocaba el fondo con las extremidades inferiores ni con la cola.

Después de la prueba, los animales se secaron en una cubeta con papel seco, antes de devolverlos a las cubetas. En todo momento el cilindro se mantuvo lo más limpio posibles y las heces se recogieron después de cada sesión.

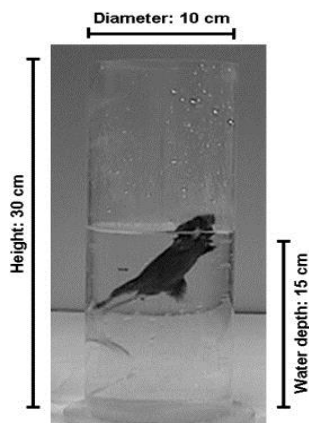


Figura 15: Imagen representativa de la prueba del nado forzado.

2.2.2 Evaluación del efecto antidepresivo del fármaco con el FST.

Las sesiones se grabaron en vídeo. Los animales intentaron escapar del estímulo aversivo (agua). Cuando aprendieron que el escape no era posible cesaron sus intentos de escapar y permanecieron inmóviles. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad. La inmovilidad se define como flotar o realizar los movimientos imprescindibles para mantenerse a flote. La eficacia antidepresiva se mide por la disminución significativa del tiempo de inmovilidad.

2.3 Prueba de suspensión por la cola (TST del inglés *Tail Suspension Test*).

El TST es un paradigma de desesperanza aprendida, al igual que el FST. Ambas prueba miden el tiempo de inmovilidad y son buenos para evaluar el efecto antidepresivo de fármacos experimentales. Este prueba se basa en colgar a los animales por la base de cola y boca abajo, de manera que queden en suspensión. El animal intentará durante el periodo de agitación recuperar una posición horizontal. Finalmente el animal aprende que no hay salida y adoptará una postura de inmovilidad (figura 16)



Figura 16: Foto representativa de un animal realizando el TST

2.3.1 Desarrollo de la prueba.

La prueba se realizó en 2 días seguidos; el primero es de habituación y el segundo el de realización de la prueba. Los animales fueron colgados por la base de la cola, con ayuda de cinta adhesiva a una altura de 25 cm del suelo. La duración de la prueba fue de 6 min.

2.3.2 Evaluación del efecto antidepresivo del fármaco con el TST.

Las dos sesiones se grabaron en vídeo. Los animales comenzaron con un movimiento vigoroso intentando escapar del estímulo aversivo (suspensión por la cola). Cuando aprendieron que no era posible librarse de la posición cesaron sus intentos de escapar y permanecieron inmóviles. Se contabilizó el tiempo de inmovilidad. El tiempo de inmovilidad es considerado como una medida de eficacia de un fármaco antidepresivo. La eficacia antidepresiva se mide por la disminución significativa del tiempo de inmovilidad.

2.4 Prueba de anidamiento.

La prueba de anidamiento está descrito como una prueba fácil de ejecutar e interpretar, que nos permite evaluar el efecto del UCMS en los roedores (Nollet, Le Guisquet et al. 2013).

2.4.1 Desarrollo de la prueba.

Se añadió un cuadrado de algodón altamente empaquetado en cada cubeta de los ratones del UCMS. Se tomaron fotos a las 5 y 24 horas.

2.4.2 Evaluación de la capacidad de anidamiento.

Se otorgaron puntuaciones del 1 al 4, siendo un 1 cuando el ratón no había tocado el cuadrado de algodón, 2 cuando el ratón desmenuza parte del algodón, 3 cuando el ratón desmenuza completamente el cuadrado de algodón, pero no forma un nido y 4 cuando forma un nido confortable con paredes y una entrada pequeña.

2.5 La jaula de actividad.

La caja de actividad es la prueba más común para analizar la función motora general e indirectamente puede proporcionar evidencias sobre la ansiedad de los animales.

2.5.1 Desarrollo de la prueba.

La prueba se realizó de forma automática gracias a un equipo de detección con fotocélulas, que emplea barreras de haces infrarrojos, y al *software* asociado Versamax. Este equipo permite monitorizar el movimiento espontáneo de los ratones.

Para un análisis de la actividad motora general, es suficiente con 5 minutos en la jaula de actividad. Una vez configurado el *software* para la prueba, se introdujo a cada animal con mucho cuidado en la cámara correspondiente. Tras cada sesión se limpiaron las cámaras con líquido desinfectante.

2.5.2 Evaluación de la actividad motora.

Los movimientos de los animales fueron analizados con el programa Versadat.

Los resultados son presentados como:

- Actividad horizontal: número total de interrupciones del haz de infrarrojos que ocurre en el sensor horizontal durante el periodo de la muestra.

- Distancia recorrida: calculada a partir del número de cortes de los haces de luz laterales, que produce el sujeto al desplazarse, mediante la multiplicación del número de cortes por la distancia entre cada dos haces de luz (2,5 centímetros). La distancia recorrida es dependiente de la trayectoria que el animal haya tomado. Por tanto, la distancia total es el indicador más exacto de actividad ambulatoria. El número indica, en centímetros, la distancia que recorrió el animal en el periodo que duró la prueba.

- Movimiento horizontal: número de movimientos horizontales discontinuos. Cada vez que ocurre una rotura en la actividad ambulatoria de más de 1 segundo, ésta variable es incrementada por 1. Esto indica el número de movimientos separados por el animal. Los movimientos individuales se separan entre ellos por un periodo de menos de un segundo.

- Tiempo movimiento: mientras el animal está deambulando, esta variable aumenta. Si el animal no ambula durante 1 segundo, la variable no incrementa. No incluye el tiempo de estereotipias.

- Tiempo en reposo: se computa como la diferencia entre el tiempo de la prueba y el tiempo que pasó en movimiento.

- Actividad vertical: es el número total de interrupciones de los haces de infrarrojos que ocurren en el sensor vertical durante la prueba.

- Número alzamientos: cada vez que el animal se levanta, ésta variable es incrementada por 1. El animal debe bajar del nivel del sensor vertical por lo menos un segundo antes de que se registre el segundo movimiento.

- Tiempo de los alzamientos: cuando el animal activa el sensor vertical por levantamiento, ésta variable comienza a incrementar y continúa incrementando hasta que el animal queda por debajo del nivel del sensor vertical.

- Número estereotipias: si el animal rompe el mismo haz de infrarrojos (o conjunto de haces) repetidamente, el monitor considera que el animal está realizando

una estereotipia. Esto ocurre típicamente cuando el animal se acicala, se arranca el pelo, etc. El número de estereotipias es el número de haces de rayos infrarrojos que se rompen en el periodo de actividad estereotípica.

- Actividad estereotipias: corresponde al número de veces que el monitor observa estereotipias en el comportamiento del animal. Se requiere 1 segundo para separar la rotura del haz de infrarrojos que indican una estereotipia, de la siguiente.

- Tiempo estereotipias: tiempo total de estereotipias que el animal ha exhibido.

- Rotaciones a la derecha: número de veces que el animal se desplaza en círculos en el sentido de las agujas del reloj (hacia la derecha). Para evitar que los movimientos estereotipados sean contados como revoluciones, el círculo descrito deberá tener por los menos 2 pulgadas de diámetro.

- Rotaciones a la izquierda: número de veces que el animal se desplaza en círculos en sentido contrario al de las agujas de reloj (hacia la izquierda). Para evitar que los movimientos estereotipados sean contados como revoluciones, el círculo descrito deberá tener por lo menos dos pulgadas de diámetro.

- Distancia recorrida en márgenes: distancia (en centímetros) que el animal recorre en los márgenes o en las esquinas de la jaula de actividad.

- Tiempo en márgenes: es el tiempo que pasa el animal en las proximidades (a menos de un centímetro) de las paredes de la jaula de actividad.

- Distancia recorrida en centro: distancia (en centímetros) que el animal recorre en el centro de la jaula.

- Tiempo en el centro: tiempo que pasa el animal lejos de las paredes de la jaula.
Intervalo = Tiempo en los márgenes + Tiempo en el centro.

- Tiempo en las esquinas: sumatorio del tiempo que el animal pasa en el área de la esquina anterior izquierda, la esquina anterior derecha, esquina posterior izquierda y esquina posterior derecha de la cámara.

2.6 Prueba del laberinto acuático (MWM; del inglés *Morris Water Maze*).

El MWM es una prueba que evalúa el aprendizaje espacial en roedores. El animal debe aprender a usar pistas visuales para orientarse y encontrar una plataforma fija y fuera de su campo visual. El animal aprende que si llega a la plataforma, el experimentador lo devuelve a su cubeta. Para evitar testar la memoria de trabajo, cada día harán un número de entradas (ensayos) por diferentes localizaciones del perímetro del tanque. El orden de entrada también se modificará de un día a otro (objetivo 5). Existen diferentes protocolos aceptados en la comunidad científica. Se empleó para objetivo 2, el protocolo de un día, y para objetivo 5 un protocolo de 4 días más una prueba de memoria a largo plazo tras 11 días de descanso.

El tanque de ratón es una piscina abierta con un diámetro de 1 m y una capacidad de 120 L. En los puntos cardinales hay unas pegatinas negras pegadas con diferentes formas geométricas. La plataforma de metacrilato está fijada a la base de la piscina y cubierta por 1 cm de agua, lo que hace la plataforma invisible para los ratones. El área del tanque se divide por dos ejes perpendiculares imaginarios en cuatro cuadrantes. La temperatura del agua es de 22°C y al final de cada día se limpió la piscina de heces.

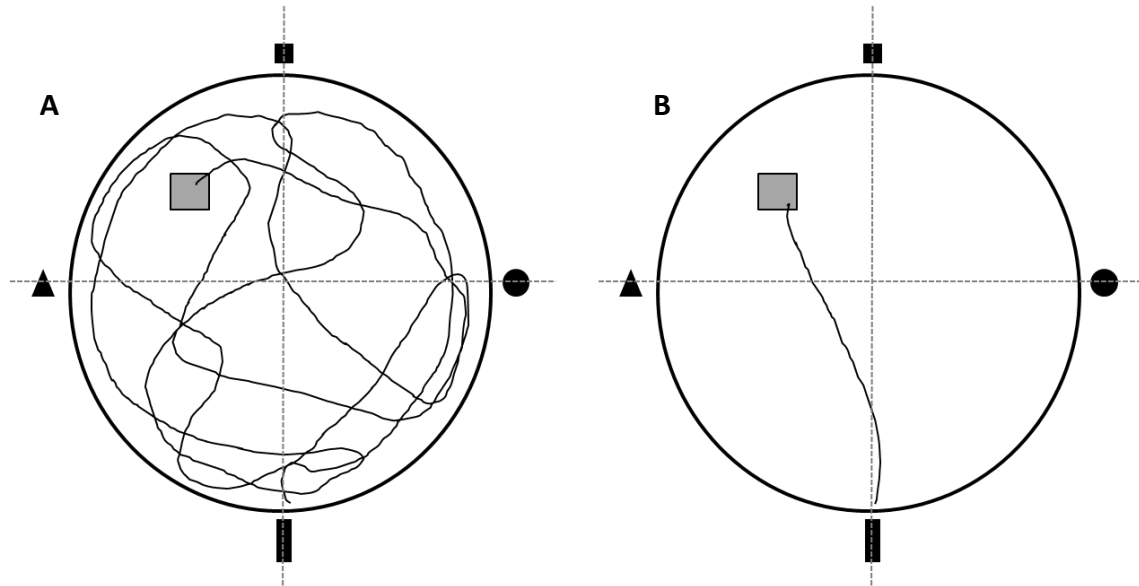


Figura 17: Esquema representativo del recorrido a nado que hace un ratón. (A) recorrido de los primeros trails. **(B)** Recorrido cuando ya ha aprendido la localización espacial de la plataforma. Las líneas punteadas representan la división de los cuadrantes.

2.6.1 MWM de un día (objetivo 2).

Para el experimento de objetivo 2 se realizó un MWM de un día.

2.6.1.1 Desarrollo de la prueba.

Antes de comenzar la prueba se permitió un periodo de habituación. En este ensayo se quitó la plataforma y se colocó al animal en el centro de la piscina, mirando hacia el experimentador. La duración del periodo de habituación fue de 1 minuto. Una vez terminado el tiempo se extrajo al animal con mucho cuidado y se depositó en una cubeta con papel. Pasada una hora de la habituación se realizó la prueba con la plataforma en su lugar. La prueba constó de 7 entradas. El orden de posición de entrada se hace de forma aleatoria. Todos los ratones pasaron por la misma entrada en cada ensayo y se introdujeron mirando hacia la clave visual. Cada ensayo tuvo una duración de 1 minuto. Durante este tiempo pudieron pasar dos supuestos. El primer supuesto se dio cuando el animal encontró la plataforma antes de que terminase el minuto, en este escenario, se esperó 3 segundos, si el animal no se bajó de la plataforma, se finalizó el ensayo para contabilizar el tiempo de escape en el ordenador (latencia de escape) e inmediatamente se encerró al animal, con mucha suavidad, en la plataforma con un cilindro de plástico durante 20 segundos. El segundo supuesto se dio cuando finalizó el minuto y el ratón no había encontrado la plataforma, en este contexto, con la ayuda de un cilindro transparente de plástico, se colocó al ratón sobre la plataforma y se dejó 20 segundos. Una vez terminado el tiempo se extrajo al animal con mucho cuidado y se depositó en una cubeta con papel. Cuando los ratones estuvieron secos se devolvieron a su cubeta original.

Después de los 7 ensayos se realizó una sonda. Durante la sonda la plataforma se retiró, lo que sirvió para testar si los animales habían aprendido la posición espacial de la plataforma. La sonda tuvo una duración de un minuto y medio y el animal se introdujo en la zona central de la piscina, orientado hacia el experimentador.

2.6.1.2 Evaluación del aprendizaje espacial.

La adquisición de los datos del aprendizaje espacial se realizó con el programa Ethovision 3.1 y con ayuda de una cámara de video acoplada al ordenador. Para obtener los datos fue necesario representar el área del tanque al que denominamos

arena. La arena a su vez se dividió por dos líneas perpendiculares en cuatro cuadrantes. El cuadrante de la plataforma lo denominamos PQ (del inglés, Platform Quadrant), el cuadrante de la derecha de PQ lo denominamos RQ (del inglés, Right Quadrant), el cuadrante situado a la izquierda del PQ lo denominamos LQ (del inglés, Left Quadrant) y el situado opuesto al PQ lo denominamos OPQ (del inglés, Opposite Platform Quadrant). Una vez bien definidos los cuadrantes, se añadió la plataforma y se representó con el nombre P (del inglés, Platform). Posteriormente se generaron áreas idénticas a la de la plataforma y se situaron en los mismos sitios virtuales de los otros tres cuadrantes (Figura 18).

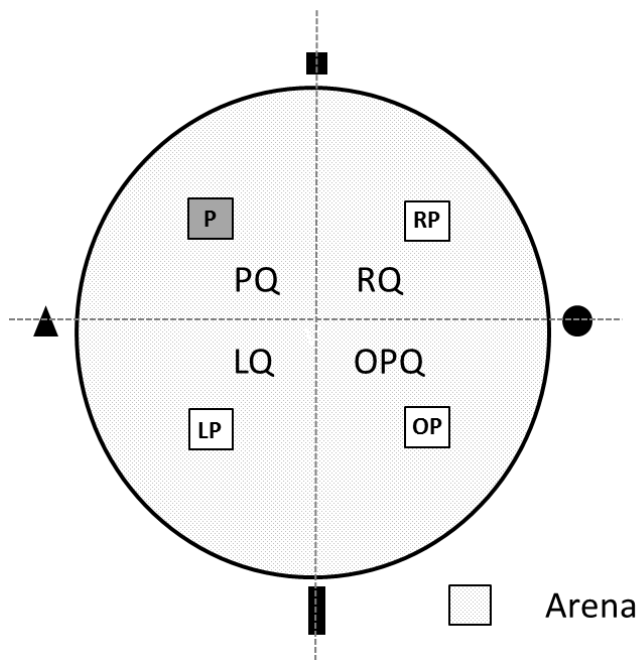


Figura 18: Esquema representativo de la arena y sus cuadrantes y las plataformas. El cuadrado gris representa la posición de la plataforma y los cuadrados blancos las posiciones virtuales de las plataformas de los otros 3 cuadrantes.

Al final de cada día se obtuvieron los valores de tiempo de la prueba, velocidad, distancia recorrida y tiempos parciales en cada una de los cuadrantes así como en la plataforma y las plataformas virtuales. El tiempo que tardan los ratones en encontrar y subirse a la plataforma se denomina latencia de escape. Para la curva de aprendizaje se utilizaron las latencias de escape de cada uno de los 7 ensayos. La sonda se evaluó calculando el porcentaje del tiempo que pasan en el cuadrante de la plataforma respecto al tiempo total de la prueba, un 1 minuto y medio, llamado preferencia por el

cuadrante de la plataforma) y el tiempo y número de veces que cruzan la plataforma, llamado cruces por la plataforma.

2.6.2 MWM clásico con evaluación del aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo.

En el objetivo 5 se realizó un MWM clásico de 4 días más una sesión de 1 día tras 10 días de descanso para evaluar a memoria a largo plazo. Para concluir se hizo una sonda transcurridas 24 h de la última sesión. La duración total de la prueba fue de 17 días. Durante este periodo los animales no realizaron ninguna otra prueba comportamental.

2.6.2.1 Desarrollo de la prueba.

Habitución: se realizó de la misma forma que con el MWM de un día (apartado anterior).

La prueba comenzó 24 h después de la habituación. Cada día se realizaron 4 ensayos, uno por cada entrada en la piscina. El orden de los *ensayos* se modificó de forma aleatoria diariamente. La metodología del ensayo fue la misma empleada que para el MWM de un día (apartado anterior). En la mayoría de los casos el día 2 ya no hizo falta del uso del cilindro y los animales esperaron en la plataforma los 20 segundos. Se hicieron 4 días de adquisiciones ya que el cuarto día tenían buenas latencias de escape (la media de los 4 ensayos era menor de 20 segundos).

Descanso: Para evaluar la memoria a largo plazo se dejaron los animales 10 días de descanso.

Prueba memoria largo plazo: tras 10 días de descanso se realizó un nuevo día de adquisición de 4 *ensayos* (día 11).

Sonda: 24 horas después de la adquisición 11 se realizó la sonda con el mismo procedimiento que en el MWM de un día (apartado anterior).

2.6.2.2 Evaluación del aprendizaje espacial, la memoria a largo plazo y la reactivación.

Se realizó con el mismo procedimiento que para el MWM de un día a excepción de la curva de aprendizaje. En este supuesto la latencia de escape de cada día se calculó haciendo la media de los 4 ensayos.

2.7 Reconocimiento de un objeto nuevo (NOR, del inglés *Novel Object Recognition*).

La prueba NOR, descrita en 1998 por Ennaceur y Delacour, se basa en la tendencia natural de los ratones a explorar un objeto nuevo frente a uno que es familiar en ausencia de reglas externas o refuerzo positivo (Ennaceur and Delacour 1988).

2.7.1 Desarrollo de la prueba.

Esta prueba es especialmente atractiva porque no requiere motivación externa, recompensa o castigo, pero sí requiere una pequeña habituación y entrenamiento, y se puede realizar en relativamente poco tiempo.

La prueba se realizó en una cubeta de metacrilato cubierta con plástico negro (30 x 40 x 40 cm) con el suelo cubierto de viruta. Los objetos se colocaron en 2 esquinas opuestas con la ayuda de un velcro fijado a la cubeta. Se utilizaron 2 pares de figuras de unos 5 cm de altura que diferían en color y forma. En todos los ensayos la viruta no se cambió entre animal y animal de una misma jaula, sin embargo al cambiar de jaula se desinfectó la cubeta para eliminar olores y se puso viruta limpia. Entre animal y animal de la misma jaula se rastrilló la viruta para evitar dejar señales del recorrido anterior.

La habituación consistió en dejar al ratón 10 minutos explorar la cubeta sin ningún objeto. Esta fase ni se grabó ni se hizo seguimiento (Figura 19).

El entrenamiento se hizo a las 24 h tras la habituación. En esta fase se colocaron 2 objetos iguales en las esquinas de la cubeta. Se introdujo al animal en el centro del campo, mirando hacia la esquina sin objeto, en dirección opuesta al investigador, y se le dejó explorar durante 10 minutos la caja. Tras esta sesión se dejó descansar al animal 5 min en su jaula. Se volvió a introducir al animal en la cubeta otros 10 minutos. Se dividió cada grupo experimental en dos subgrupos, un subgrupo del grupo vehículo y del grupo VP2.51 realizó el entrenamiento con dos objetos y los otros dos subgrupos

con otros dos objetos diferentes a los objetos utilizados en los subgrupos anteriores. Estos objetos se denominarán de ahora en adelante como objeto conocido. Durante esta fase tampoco se grabó ni realizó seguimiento. Al terminar cada sesión los objetos se limpiaron con desinfectante (Figura 19).

La prueba se realizó 24 h después de la habituación. Para evitar datos sesgados por la preferencia hacia un objeto determinado, los subgrupos incorporaron en la esquina superior izquierda el objeto nuevo (objeto novel) que a su vez resultó ser el objeto conocido de los otros 2 subgrupos. En la esquina opuesta se situó el objeto conocido. De nuevo se situó en el centro del campo mirando hacia la esquina sin objeto, en dirección opuesta al investigador y se dejó a los animales explorar durante 10 minutos. Esta fase se grabó y se evaluó la memoria (Figura 19).

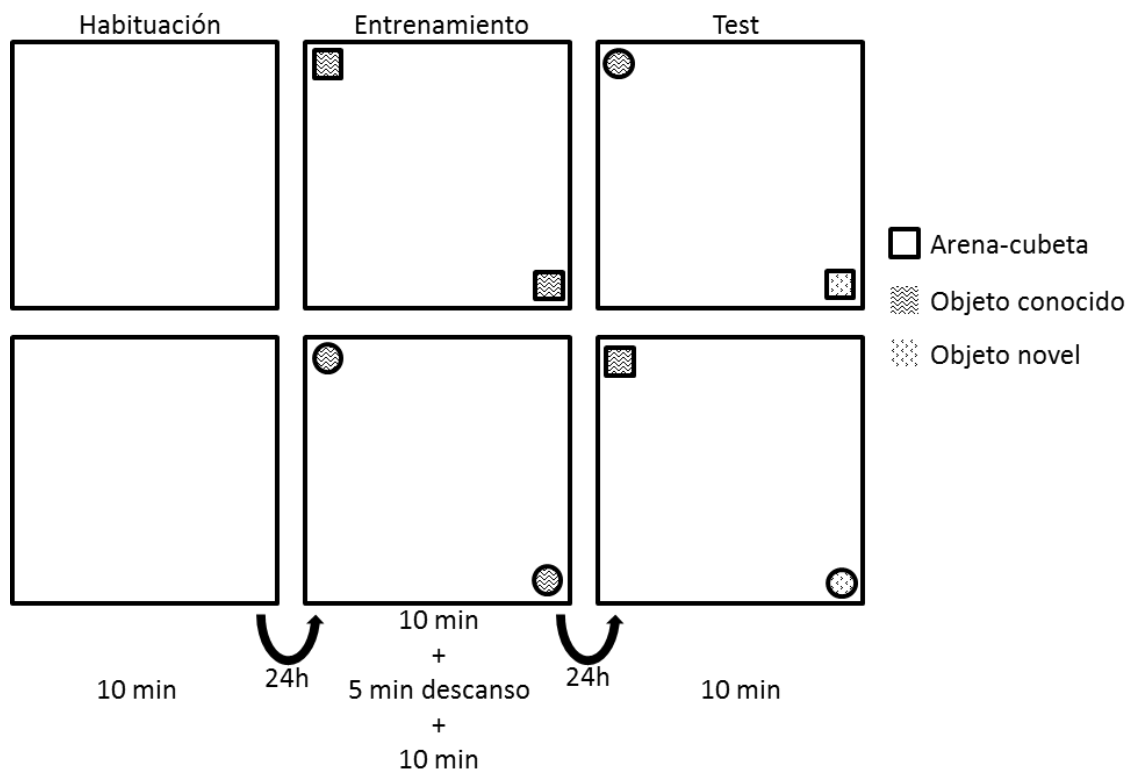


Figura 19: Se representa el protocolo del NOR.

2.7.2 Evaluación de la memoria a largo plazo.

Los movimientos de los animales fueron grabados y analizados con el programa EthoVision XT software v 3.0. La preferencia por explorar el objeto novel se define por la siguiente fórmula:

$$Id = \frac{tn - tf}{tn + tf}$$

Siendo *Id* el índice de discriminación, *tn* el tiempo de exploración del objeto novel y *tf* el tiempo de exploración del objeto conocido. Este índice puede tener valores entre -1 y +1, valores positivos significan una mayor preferencia al objeto novel y valores negativos una preferencia al objeto conocido.

2.8 Prueba de aprendizaje de evitación pasiva (PA, del inglés *Passive Avoidance*).

El PA es una tarea de condicionamiento al miedo que mide la capacidad de un ratón a aprender y a recordar una asociación entre una experiencia y un determinado ambiente.

El aparato empleado es una cámara rectangular dividida en dos compartimentos. Un compartimento es blanco e iluminado con luz blanca de 10W anclada a la tapa de la jaula. El otro compartimento es negro y oscuro. Los dos compartimentos están separados por una puerta automática a modo de guillotina. Todo el suelo es de rejilla, y la de la zona oscura puede transmitir descargas eléctricas (figura 20).

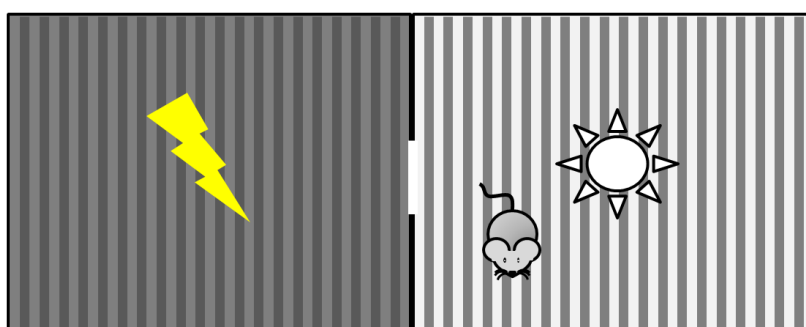


Figura 20: Representación esquemática del PA. A la derecha se encuentra el compartimento luminoso. Los dos compartimentos están separados por una puerta corredera automática (en blanco) y a mano izquierda el compartimento oscuro, donde el animal recibe la descarga eléctrica.

El ratón debe aprender a evitar pasar de un compartimento luminoso y aversivo a un compartimento oscuro y aparentemente seguro, pero en el que previamente ha aprendido que recibe una descarga cuando entra en él. La latencia del ratón en cruzar al compartimento de castigo sirve como medida de aprendizaje.

2.8.1 Desarrollo de la prueba.

La prueba se realizó en tres días consecutivos. El primer día se realizó la habituación al PA. Se depositó al ratón en el centro del compartimento blanco iluminado con la puerta cerrada. 30 segundos después se abrió la puerta que comunicaba ambos compartimentos. Una vez el animal pasó al compartimento oscuro la puerta se cerró e inmediatamente se sustrajo al animal del aparato para devolverlo a su cubeta. Se anotó el tiempo de latencia en pasar del compartimento blanco e iluminado al compartimento negro y oscuro (latencia de escape). El tiempo máximo de la prueba desde que se abre la puerta hasta que finaliza es de 5 minutos. Se limpió el aparato entre animal y animal.

El segundo día se realizó el entrenamiento del PA. En este ensayo se realizó replicando el protocolo de la habituación, a excepción de que cuando el animal pasó al compartimento oscuro se le dio una descarga de 0,5 mA de 2 s de duración. Se registró la latencia de escape y se anotó si el animal emitió vocalizaciones o no. En todos los casos los animales emitieron vocalizaciones.

El tercer día se realizó la prueba de memoria a largo plazo. De nuevo se procedió de la misma manera que en la habituación (sin descarga). Se anotó la latencia de escape. En caso de que el animal no pasase al compartimento oscuro la latencia de escape tendría un valor de 300 s (5 min).

2.8.2 Evaluación de la memoria a largo plazo.

Se evaluaron las latencias de escape en la habituación, entrenamiento y prueba de memoria a largo plazo.

3. Modelo de depresión mayor (MDD, del inglés Major Depressive Disorder) mediante un estrés suave crónico e impredecible (UCMS, del inglés *Unpredictable Chronic Mild Stress*).

El modelo consiste en una exposición repetida a una serie de factores estresantes leves, variados e impredecibles durante un periodo de tiempo prolongado. La validez de este modelo está apoyada en que replica muchas de las alteraciones comportamentales características de la depresión.

Inicialmente partimos de un grupo de 40 ratones, que se dividieron en 30 ratones UCMS y 10 ratones controles. Mientras los ratones controles se estabularon en condiciones normales, los 30 ratones de UCMS se estabularon en una sala apartada y se aislaron en cubetas de 370 cm². Antes de comenzar el protocolo de UCMS se pesaron todos los animales. Semanalmente se realizó un seguimiento del peso corporal y del estado del pelaje. A las cuatro semanas de UCMS se realizó un EPM (para más detalles ir al punto 2.1 Prueba del Laberinto en Cruz). Con los datos obtenidos de esta prueba y los pesos se dividió el grupo experimental UCMS en tres grupos experimentales homogéneos, vehículo, VP2.51 y fluoxetina.

Se utilizó una batería de estreses que incluía:

- Uso de serrín mojado durante tiempos variables entre 1 y 2 horas.
- Cambios sucesivos de serrín cada hora.
- Mezcla de serrín con excrementos de otros ratones durante un par de horas.
- Serrín con excrementos de rata durante 2 horas.
- Ausencia de serrín 2 horas.
- Baño de agua (se añadió 125 ml de agua en cada cubeta sin serrín durante un periodo de 30 minutos a 1 hora).
- Adición de una pequeña cantidad de serrín no suficiente para cubrir toda la base de la cubeta.

- Deprivación de agua y/o pienso durante 16h y seguidamente una exposición, durante un intervalo variable de entre 1 hora y 2 horas, a un biberón vacío y/o comida inaccesible.

- Alteraciones de los ciclos luz oscuridad. Se respetaron 12 horas de luz y 12 de oscuridad, pero con patrones de encendido y apagado variables.

- Sesiones de 20 minutos con cantos de aves depredadoras.

- Se utilizó un programador para activar diferentes tipos de ruidos de una radio, se utilizó desde emisoras de radio, hasta el ruido producido por la falta de sintonización.

- Se utilizaron canicas como estímulo brillante y aversivo en las cubetas.

- Se dispusieron las cubetas con una inclinación de 45º, así como sobre el lateral más pequeño durante periodos de 1 hora.

- Se enfrentaron las cubetas por la rejilla, de manera que tenían, en parejas de dos, contacto visual pero no físico.

- Se les depositó en una superficie pequeña, sin paredes y a una altura de un metro y medio durante 10 minutos.

- Restricción espacial durante un periodo de 10 min.

A continuación se muestra una serie de imágenes tomadas durante el desarrollo del protocolo (figura 21).

Se comenzó realizando 4 estreses diarios y espaciados en el tiempo. Tras la evaluación de los pesos la segunda semana se incrementó la frecuencia de los estreses y algunos se llevaron a cabo de forma simultánea.

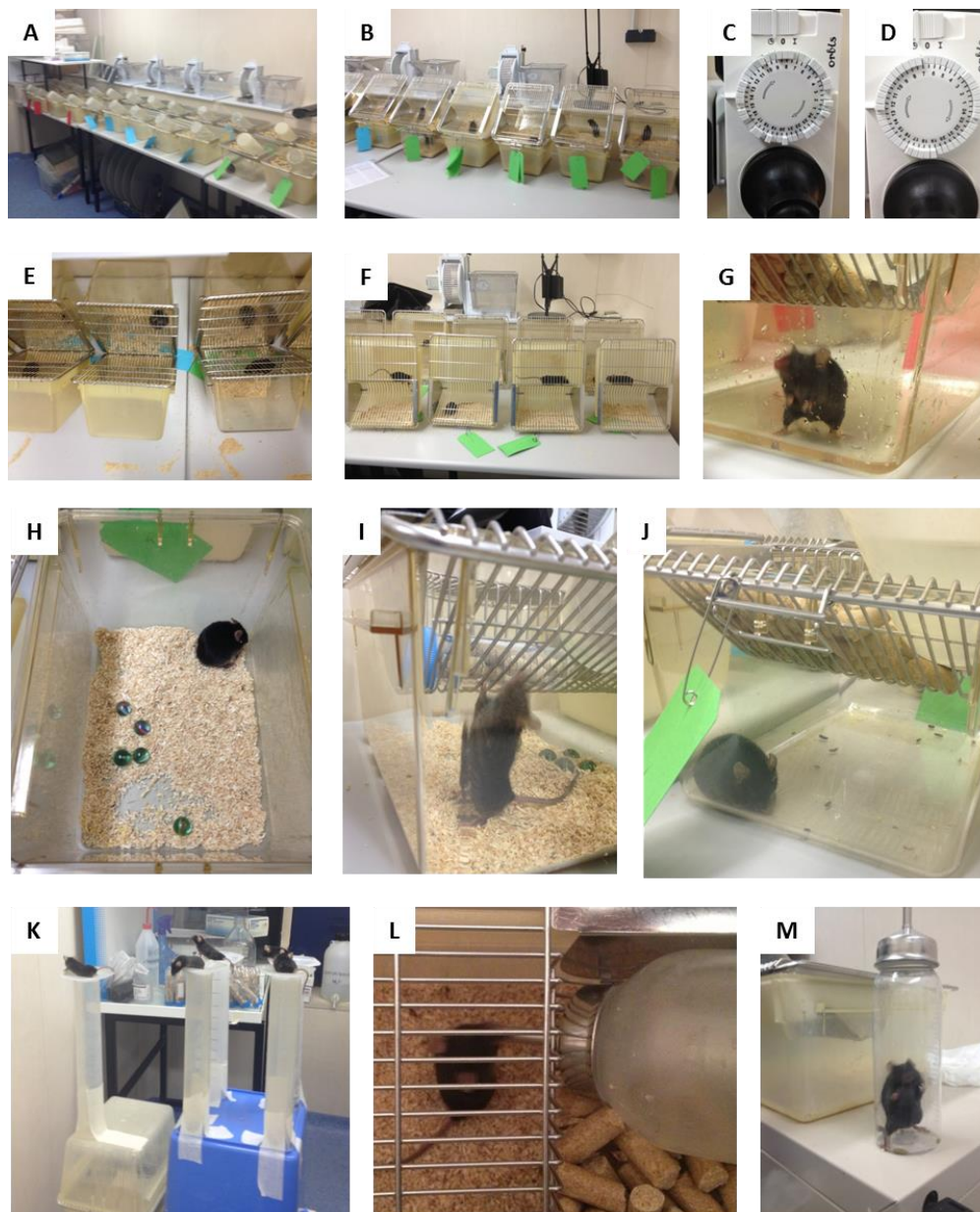


Figura 21: Fotos tomadas durante el desarrollo del UCMS. (A) Cubetas con ratones estabulados individualmente en una sala aislada. **(B)** Cubeta con una inclinación de 45°. **(C)** Temporizador con patrón aleatorio, respetando 12h de luz y 12h de oscuridad. **(D)** Temporizador con un ritmo diferente de encendido y apagado. **(E)** Cubetas enfrentadas. Los ratones tienen contacto visual, pero no físico. **(F)** Cubetas tumbadas sobre un lateral. **(G)** Baño de agua. **(H)** Uso de canicas. **(I)** Tras 16h de privación de comida, se exponen a un pienso inaccesible. **(J)** Ausencia de serrín. **(K)** Plataforma en altura. **(L)** Tras 16h de privación de agua, se coloca un biberón vacío. **(M)** Restricción espacial dentro de un biberón.

4. Análisis bioquímicos (*Western Blot*).

4.1 Obtención de la muestra y cuantificación de proteína.

Una vez diseccionado el tejido y almacenado a -80°C (apartado 1.4 de material y métodos) se procedió a su lisis. Para ello se pesaron la estructuras y se añadió 10 veces su peso (mg) en volumen (µl) de tampón de lisis (composición descrita en la tabla 3). Inmediatamente después se sonicó durante 5 seg y se mantuvo en hielo. Se comprobó que estaba bien lisado, en caso de quedar fragmentos sin lisar se volvió a sonicar 5 seg. Con esta segunda sesión fue suficiente para lisar completamente el tejido. Posteriormente se centrifugó 10 min a 14 K. Se recogió el sobrenadante y se alicuotó. Las alícuotas se conservaron a -20°C.

Compuesto	Concentración final	Casa comercial	Referencia
HEPES pH 7,9	20 mM	Sigma	H-3375
NaCl	100 mM	Merk	1064001000
EGTA	1mM	Sigma	324503
EDTA	1mM	Merk	324503
Tritón X-100	1%	Sigma	T8787
DTT	5 mM	Sigma	D-9779
Ortovanidato de Na	1 mM	Sigma	S-6508
NaF	2 mM	Sigma	S-7920
Inhibidor de proteasa	1x	Roche	1836153
Agua bidestilada	Hasta completar volumen		

Tabla 3: Composición del tampón de lisis.

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método colorimétrico Bradford (Bio-Rad 500-0201) y siguiendo las instrucciones del fabricante se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro lector de placas. De forma paralela se realizó por duplicado una curva patrón con concentraciones de proteína conocidas.

4.2 Electroforesis y transferencia.

Se cargaron entre 10 y 30 µg de proteína por pocillo previamente desnaturalizadas por calor. En función del tamaño de la proteína se prepararon geles de entre el 7,5-15% de acrilamida. Se utilizó como marcador de peso molecular el Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific 26634). Se realizó la electroforesis durante 30 minutos a 50 mV y, a continuación, a 150 mV hasta que la banda correspondiente a la proteína de interés estaba situada en la zona central y resolutive del gel.

Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio Rad 162-0177) durante 1h a 100 mV.

4.3 Inmunodetección de las proteínas.

La inmunodetección se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del *Kit WesternBreeze* (Invitrogen WB7104, WB7106). Los anticuerpos primarios se incubaron O/N o 1 h en función de las especificaciones del anticuerpo. La inmunodetección del epítipo fosforilado de la ser-9 de GSK3 se llevó a cabo en primer lugar, nunca después de realizar un stripeado. A continuación se detalla una tabla con los anticuerpos utilizados (tabla 4).

Anticuerpos primarios Western Blot					
Anticuerpo	µg proteína	Especie	Dilución	Casa comercial	Núm Catálogo
P-GSK3β (Ser9)	20	Conejo	1:1000	Cell Signaling	5558
GSK3 total	20	Ratón	1:2000	Millipore	05-412
β-catenina	25	Ratón	1:2000	BD	610153

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en WB.

Una vez revelada la señal del anticuerpo quimioluminiscente se stripearon las membranas durante 30 minutos a 70°C en tampón de *stripping* (tabla 5).

Compuesto	Concentración final	Casa comercial	Referencia
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM	Roche	03118142001
SDS	2%	Sigma	L4390
B-mercaptoEtOH	100 mM	Sigma	M6250
Agua bidestilada	Hasta completar volumen		

Tabla 5: Composición del tampón de *stripping*.

Los niveles relativos de proteína se cuantificaron con el *software* Quantity one. Se determinaron los niveles de β III-tubulina o β -tubulina como control de carga.

5. Inmunohistoquímica (fluorescencia).

5.1 Obtención de las secciones de tejido.

Para la técnica inmunohistoquímica se utilizaron los hemisferios fijados en PFA (apartado 1.4 de material y métodos). Los cerebros postfijados en PFA se lavaron en PB 0,1 M e inmediatamente se obtuvieron secciones coronales, de un grosor de 50 μ m, de la formación hipocampal. Para ello se utilizó un vibratomo (VT-1000s, Leica), las secciones se recogieron individualmente en pocillos de una placa de 96 pocillos cargada con PB 0,1 M. De cada hemisferio se obtuvieron 8 series de tejido.

5.2 Desarrollo de la inmunohistoquímica.

Las inmunohistoquímicas se realizaron inmediatamente después de seccionar los cerebros en el vibratomo con el fin de trabajar con el tejido lo más fresco posible. Se

utilizó una serie de tejido por inmunohistoquímica. Las secciones se inmunotñieron en flotación. Todas las incubaciones se realizaron en agitación suave. Para visualizar el marcador de interés se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo.

Primero se bloqueó en PB 0,1M, Tritón X-100 al 1%, BSA al 1% (PBTBSA) durante 5 minutos. Posteriormente se hicieron 5 lavados con PBTBSA. A continuación se incubó el anticuerpo primario diluido en PBTBSA durante 1 h a RT y, durante 3 días, a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavaron 5 veces con PBTBSA. Después de los lavados, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a RT + O/N a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PB 0,1M. Seguidamente se incubaron con DAPI 1 µg/mL en PB 0,1M (Sigma D9542). Se finalizó lavando 3 veces con PB 0,1M y montando las secciones sobre portaobjetos gelatinizados. Se cubrieron con Gerbatol y se almacenaron a 4°C y en oscuridad.

Anticuerpos primarios utilizados				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Num Catálogo
DCX	Cabra	1:500	Santa Cruz	Sc-8066
Calretinina	Conejo	1:3000	Swant	7699/4
pH3	Conejo	1:500	Upstate	06-570
Prox1	Conejo	1:500	Chemicon	AB5475
Ki67	Conejo	1:750	Thermo Scientific	RM-9106-S0
BrdU	Rata	1:500	Abcam	Ab6323
CldU	Rata	1:100	Accurate	OBT0030S
IdU	Ratón	1:100	BD	347583

Tabla 5: Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.

Anticuerpos secundarios utilizados					
Anticuerpo	Visualización	Especie	Dilución	Casa comercial	Núm Catálogo
Alexa anti-cabra	Excitación 594nm	Burro	1:1000	Invitroven	A-11058
Alexa anti-conejo	Excitación 594nm	Burro	1:1000	Invitroven	A-21207
Alexa anti-conejo	Excitación 488nm	Burro	1:1000	Invitroven	A-21206
Alexa anti-rata	Excitación 488nm	Burro	1:1000	Invitroven	A-21208
Alexa anti-ratón	Excitación 594nm	Burro	1:1000	Invitroven	A-21203
Anti-conejo biotinilado	Estreptavidina- Biotina DAB	Cabra	1:1000	Sigma	B8895

Tabla 6: Anticuerpos secundarios utilizados en las inmunohistoquímicas.

Para las inmunohistoquímicas de análogos de timidina, después del bloqueo, se incubaron las secciones en HCl 2 N a RT durante 40 min. Posteriormente se hicieron 5 lavados con PBTBSA para eliminar todos los restos de ácido. La incubación del anticuerpo primario fue de una semana a 4°C y el anticuerpo secundario 3 días a 4°C. Se detalla en dos tablas los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunohistoquímicas (tabla 5 y tabla 6).

6. Tinción histológica con la técnica Nissl.

Esta tinción basófila tiñe todos los núcleos de las células (neuronas y glía) así como el retículo endoplasmático rugoso y los ribosomas libres. Sirve para estudiar la citoarquitectura del Giro Dentado, en especial la SGZ.

Una serie completa de cada animal (ver apartado 3.1) se utilizó para la tinción Nissl. Las secciones de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire durante 2 días. Las preparaciones se sumergieron en orden numérico, como indica la figura 22, en el colorante azul de toluidina (Sigma, 89640) 13 minutos (1), posteriormente se quitó el exceso de colorante con un papel (2) y se lavó en agua destilada 10 seg (3). Posteriormente comenzó la deshidratación progresiva en concentraciones creciente de alcohol. Se comenzó sumergiendo 2 min en Etanol al

70% a continuación (4), 2 min etanol al 96% (5), seguidamente 2 min en etanol al 100% (6), este último paso se repitió de nuevo durante 2 min (7). Finalmente se sumergió 2 min en xileno (8) y se procedió a su montaje (9). Se cubrieron con DePex (Sigma 44581) y se dejaron secar.

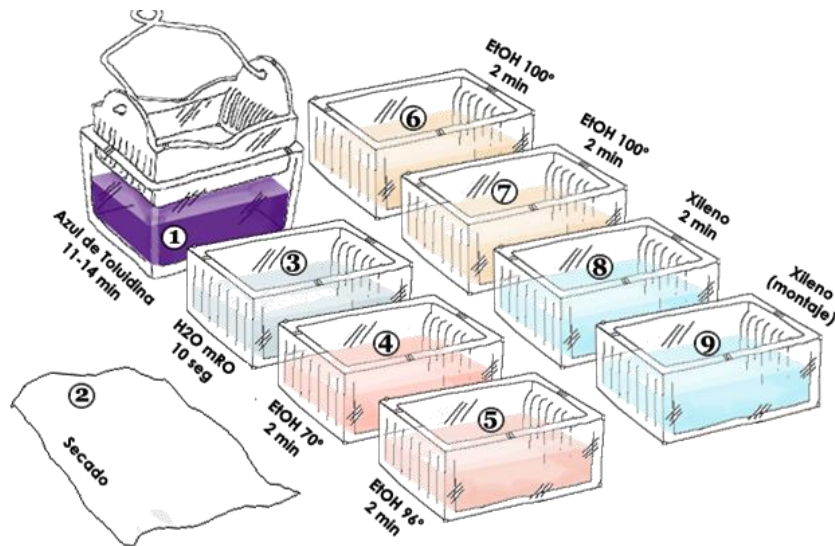


Figura 22: Ilustración representativa del protocolo de la tinción Nissl.

7. Determinación del volumen hipocampal, volumen del giro dentado y área de la SGZ mediante el método de Cavalieri.

El método de Cavalieri es un método estereológico para estimar el volumen de un espacio de referencia. Se basa en el principio: “Si dos cuerpos tienen la misma altura y además tienen igual área en sus secciones planas realizadas a una misma altura, entonces poseen igual volumen”. El volumen del objeto es por tanto la suma de las áreas de las secciones seleccionadas multiplicadas por la distancia constante que las separa (figura 23).

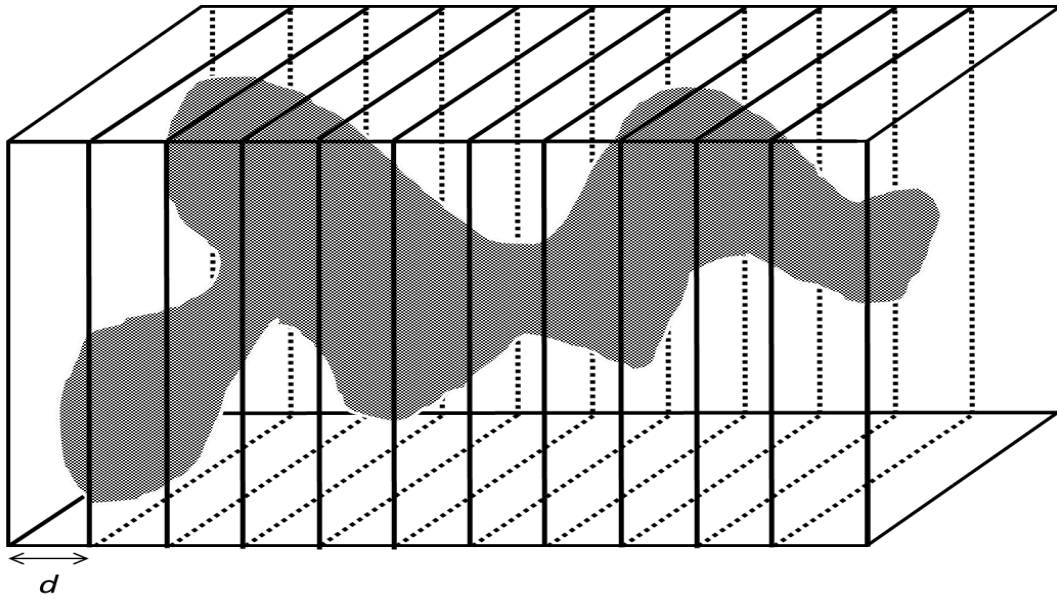


Figura 23: Representación de la estimación del volumen de una estructura imaginaria con el método de Cavalieri. El volumen del objeto es la suma de las áreas de las secciones multiplicadas por la distancia (d) constante que las separa.

La posición de la primera sección debe ser aleatoria en un intervalo de 0 a d . Otro factor a tener en cuenta es la complejidad de la estructura para determinar cuántas secciones son necesarias para realizar una buena estimación volumétrica. En el caso de la formación hipocampal, giro dentado y SGZ es suficiente con una serie de las 8 obtenidas en el vibratomo.

Para determinar los volúmenes hipocampales, del giro dentado y el área de la SGZ se hizo uso de las series teñidas con la tinción Nissl. Los cortes se cuantificaron en el microscopio óptico Nikon 80i con una platina motorizada acoplada y el *software* Neurolúcida (Figura 24).

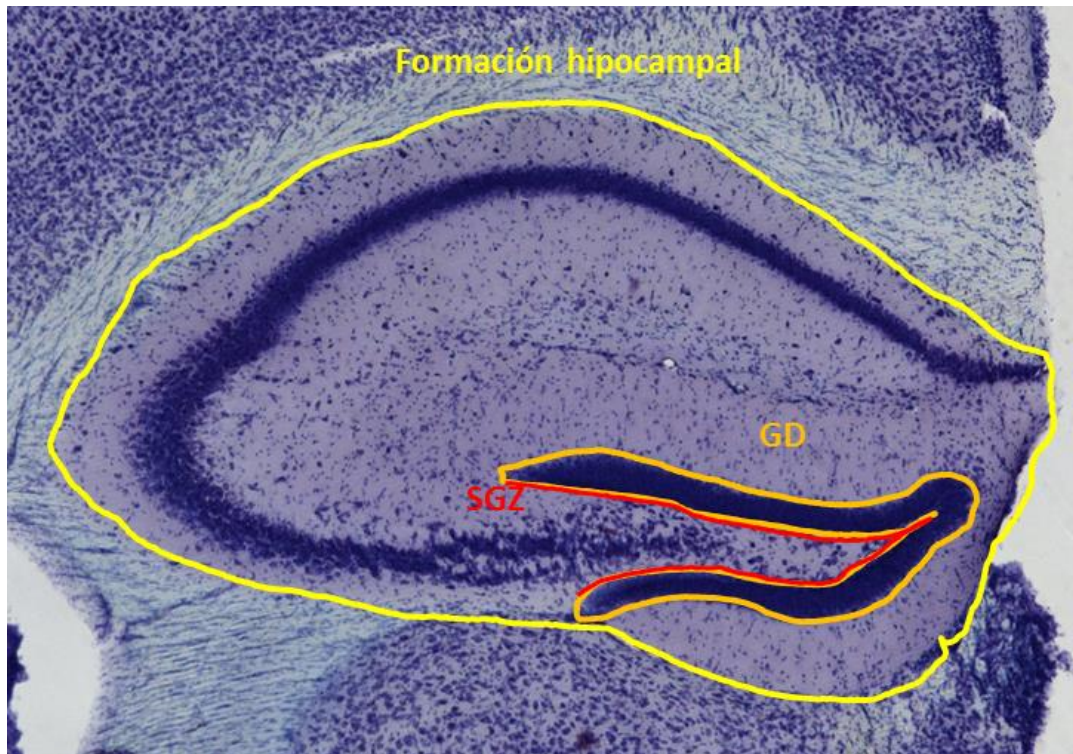


Figura 24: Imagen representativa de un corte rostral teñido con la tinción Nissl. En amarillo la formación hipocampal, en naranja el giro dentado (GD) y en rojo la zona subgranular (SGZ).

7.1 Cuantificación del volumen del giro de la formación hipocampal.

Para estimar el volumen de la formación hipocampal, se dibujó el perímetro de la formación hipocampal de cada uno de los cortes de la serie, con la ayuda de una tableta digitalizadora. Como referencia general nos ayudamos utilizando el Atlas de cerebro de ratón Paxinos (Paxinos 2012).

El volumen total se calculó haciendo el sumatorio de las áreas multiplicado por la distancia entre corte y corte.

$$\text{Volumen Total Formación Hipocampal } (V_{hip}) = \sum A * d$$

Siendo A el área de la formación hipocampal de cada corte y $d = 400 \mu\text{m}$ de distancia ($50 \mu\text{m}$ grosor del corte * 8 series).

7.2 Cuantificación del volumen del giro dentado del hipocampo.

Para estimar el volumen de giro dentado de la formación hipocampal, se dibujó, con la ayuda de una tableta digitalizadora, el perímetro del giro dentado de cada corte y se multiplicó por la distancia entre corte y corte.

$$\text{Volumen Giro dentado (VGD)} = \sum A * d$$

Siendo A el área del Giro Dentado de cada corte y $d = 400 \mu\text{m}$ de distancia (50 μm grosor del corte * 8 series).

7.3 Cuantificación del área de SGZ.

Para estimar el área de la SGZ del Giro Dentado de la formación hipocampal se utilizó un Cavalieri ligeramente modificado. En lugar de tener el área de una sección y estimar el volumen multiplicando por la distancia, lo que vamos a tener es una longitud multiplicada por una distancia que nos dará un área. Se dibujó, con la ayuda de una tableta digitalizadora, la longitud de la SGZ de cada corte y se multiplicó por la distancia entre corte y corte.

$$\text{Área Total SGZ (At)} = \sum L * d$$

Siendo L la longitud de la SGZ de cada corte y $d = 400 \mu\text{m}$ de distancia (50 μm grosor del corte * 8 series).

8. Análisis estereológico de las poblaciones neuronales.

Para comparar el número de neuronas en los diferentes grupos experimentales es fundamental hacer un buen diseño estereológico. En función de las características de densidad y distribución, se diseñaron diferentes estrategias con el fin de obtener la estimación más correcta y cercana a la realidad (tabla 7).

Estrategias estereológicas	
Inmunohistoquímica	Estrategia
pH3	Fraccionador
BrdU	
CldU/IdU	
Ki67	
Prox/BrdU	Disector físico direccionado
DCX/Calret	Disector físico en forma de U

Tabla 7: Resumen de las diferentes estrategias estereológicas empleadas.

8.1 Método del Fraccionador.

Cada serie es 1/8 de fracción del hipocampo. Se cuantificaron todos los cortes en un microscopio óptico (Leica DMI 6000) con un objetivo de inmersión 40x 1.00 de apertura numérica. Los filtros se indican en la tabla 8. El número total de células se obtuvo:

$$\text{Numero total de células} = \sum \text{células cortes} * 8$$

Filtros			
Color	excitación	Dicroico	Emisión
Azul (DAPI)	BP 340-380	400	LP 425
Verde (488)	BP 470/40	500	BP 525/50
Rojo (594)	BP 560/40	595	BP 645/75

Tabla 8: Ejemplo de los filtros utilizados en el microscopio óptico para cuantificar las inmunohistoquímicas mediante fraccionador.

En los estudios de las sub-regiones hipocampales se determinó la región dorsal y la región ventral, con ayuda del atlas de cerebro de ratón Paxinos, entre las coordenadas

estereotaxicas (Bregma) -1,60 y -2,70 mm, y -2,70 y 3,60 mm respectivamente (Paxinos 2012).

8.2 Método del Disector físico en U.

8.2.1 Obtención de los disectores.

Con la ayuda del servicio de Imagen Científica y Microscopía del Instituto Cajal, se hicieron fotos en el microscopio confocal Leica SP-5 Directo. Con el Objetivo de inmersión 63x y 1.40 de apertura numérica se toman 6 *stacks* por animal, 3 suprapiramidales y 3 infrapiramidales. Nos referiremos a *stack* como el conjunto de fotos de los diferentes planos tomados en una posición espacial concreta. Cada *stack* consta de 11 imágenes, una $z \approx 17 \mu\text{m}$ y un tamaño de $100 \times 100 \mu\text{m}$. Las fotos se hacen a una resolución de 512 y con un zoom de 2.46. Cada *stack* corresponderá a un disector físico en U.

8.2.2 Cuantificación del número de células por unidad de área de SGZ.

Una vez hechas las fotos se cuantificó con la ayuda del *cell counter* de ImageJ. Se contaron el número de DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y las Calret⁺/DCX⁻ en cada *stack*.

8.2.3 Cuantificación del número total de células en la SGZ de la formación hipocampal.

Una vez obtenidos el número de células por unidad de área de SGZ y el área total de la SGZ (apartado 7.3) podemos calcular el número total de células multiplicando los dos factores.

$$\frac{\text{Número de Células positivas}}{\text{Área Stack}} * A_t = \text{Número total de Células}$$

8.3 Método del Disector físico direccionado.

Con la ayuda del servicio de Imagen Científica y Microscopía del Instituto Cajal, se hicieron fotos en el microscopio confocal Leica SP-5 Directo. Con el objetivo de inmersión de 63x se hicieron 5 *stacks* por animal. Cada *stack* se hizo en las zonas donde había una al menos 2 células BrdU positivas.

Con ayuda del ImageJ se cuantificó el número de células BrdU que eran Prox1 positivas. Los resultados se muestran como el porcentaje el células que son BrdU⁺/Prox1⁺ sobre el número total de células muestreadas, así como las células BrdU⁺/Prox1⁻. La suma del porcentaje de las BrdU⁺/Prox1⁺ más las BrdU⁺/Prox1⁻ es el 100%.

9. Análisis estadístico.

Para realizar los test estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statics software v. 19. La prueba estadístico varió según el número de grupos a comparar.

i) 2 grupos: t de Student de dos colas, para Ns altas. O el test no paramétrico U Mann-Whitney para Ns bajas.

ii) Más de 2 grupos:

Si hay homocedasticidad: ANOVA de una vía. Dado que el efecto de los tratamientos es diferente, interesó realizar una comparación múltiple a posteriori (*post-hoc*). Aunque existen varios procedimientos, no hay un acuerdo universal sobre cuál se debe utilizar. Los más clásicos y conocidos son el de Bonferroni y el de Scheffé (Domenech 1980, Martínez-Gonzalez 2001). Se utilizó Bonferroni cuando interesó comparar todos los grupos de manera independiente y Dunnet cuando interesó comparar los grupos experimentales con el control.

III) Medidas que se repiten en el tiempo para cada animal: ANOVA de medidas repetidas.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de p menor de 0,05 en la t de Student, en la U-Mann-Whitnry y en el ANOVA. En el *post-hoc* se realizó un procedimiento de penalización de valores P, y sólo se consideró significativa una p menor de 0,0125 ($P_{\text{penalizada}} = P_{\text{global}} / \text{número de comparaciones}$).

RESULTADOS

Estudios previos con el VP2.51:
Diseño, síntesis y estudios *in vitro*.

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar el efecto del VP2.51, inhibidor de la GSK-3 en la neurogénesis hipocampal adulta y las conductas hipocampo-dependientes, con especial atención al posible efecto antidepresivo. Para ellos utilizamos un inhibidor de la GSK-3 no comercial. Previo al trabajo de esta tesis se realizaron diversos trabajos entre los que destacan en primer lugar el diseño, síntesis y evaluación enzimática. En segundo lugar los estudios *in vitro* para estudiar el efecto del fármaco en neuroesferas de origen murino. Y finalmente el ensayo de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). A continuación presentaremos estos datos para validar el uso experimental de este compuesto.

1. El diseño, síntesis y evaluación enzimática del VP2.51

El diseño, síntesis y evaluación enzimática del VP2.51 se ha llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Ana Martínez del Instituto de Química Médica del CSIC. La molécula VP2.51 es un derivado del AR-A014418 capaz de inhibir la enzima GSK-3 en rangos sub-micromolar de forma reversible y ATP-competitiva.

1.1 Diseño del VP2.51

El diseño de nuevos fármacos puede hacerse teniendo en cuenta muy diversas consideraciones biológicas y estructurales. Aunque la gran mayoría de los inhibidores de GSK-3 han sido descubiertos mediante cribado de librerías químicas más o menos complejas y utilizando métodos de cribado de alto rendimiento o high throughput Screening (HTS) (Conde, Perez et al. 2003, Alonso and Martinez 2004, Eldar-Finkelman and Martinez 2011). A partir de estos primeros prototipos, se han realizado modificaciones racionales de la estructura química para variar diferentes propiedades biológicas o físico-químicas. Como se explicó en la introducción, el AR-A014418 es un inhibidor ATP-competitivo. A partir de este compuesto y las coordenadas tridimensionales de su complejo con GSK-3, se procedió al diseño *in silico* del derivado

VP 2.51, en el que se modificaron los sustituyentes del anillo heterocíclico de tiazol con el fin de ganar novedad en la estructura química sin perder actividad biológica (Figura 25).

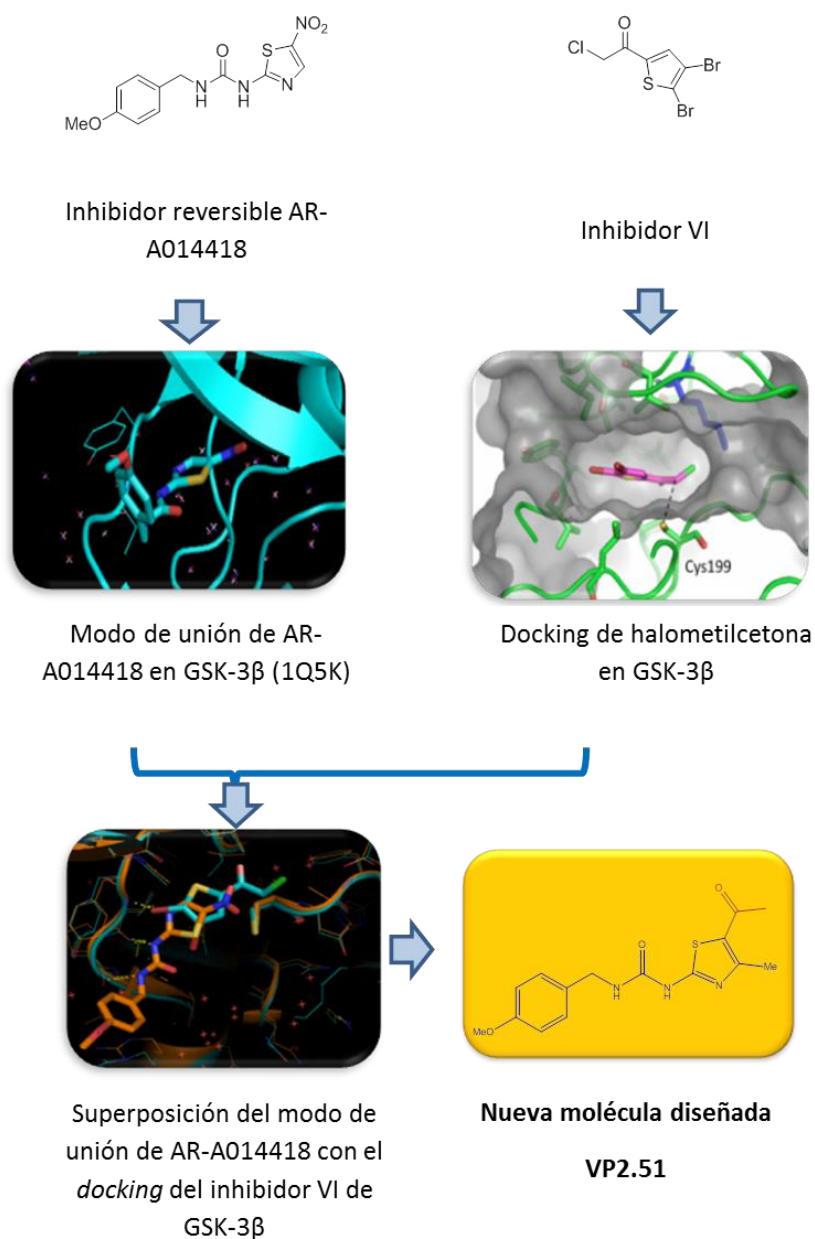


Figura 25: Estrategia para el diseño del inhibidor de GSK-3β VP2.51.

1.2 Síntesis del VP2.51

El derivado VP2.51 se sintetizó en un solo paso mediante una síntesis convergente por adición nucleófila del 5-acetil-2-amino-4-metiltiazol sobre el 4-

metoxibencilisocianato en un disolvente aprótico, como la dimetilformamida, calentando a 100 °C durante 12 h. Este procedimiento es similar al descrito para la síntesis del inhibidor AR-A014418 utilizando como modelo en el diseño de esta nueva molécula (Figura 26).

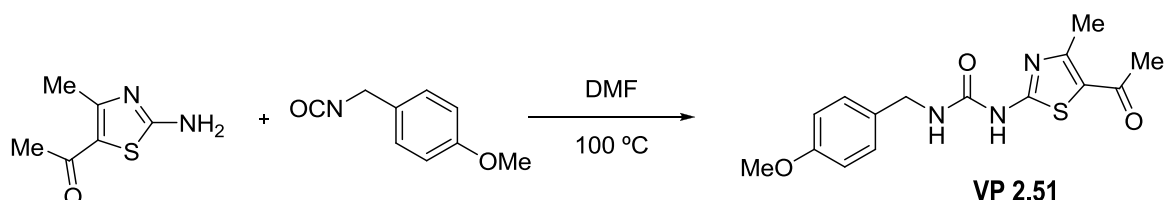


Figura 26: Síntesis del VP2.51

1.3 Evaluación enzimática.

El derivado sintetizado VP2.51 se evaluó frente a la enzima GSK-3 β utilizando un ensayo de inhibición enzimática no radiactivo implantado en el grupo de neurofármacos del IQM-CSIC. La Cl_{50} corresponde a la concentración de compuesto que es capaz de inhibir la enzima al 50% de su actividad enzimática. De esta manera la Cl_{50} para VP2.51 resultó ser de $0.60 \pm 0.15 \mu\text{M}$.

Con el fin de estudiar el mecanismo de inhibición enzimática, se llevaron a cabo diferentes estudios de cinética enzimática. Primero se estudió la reversibilidad de la unión a la enzima. Como controles se midieron las reversibilidades de dos inhibidores de GSK-3 β con cinéticas conocidas: Alsterpaulona como inhibidor ATP-competitivo (Leost, Schultz et al. 2000) y HMK-323 como inhibidor ATP-no competitivo (Conde, Perez et al. 2003). Las concentraciones utilizadas de cada compuesto fueron cercanas a los valores de sus Cl_{50} respectivamente, y los resultados se muestran en la figura 27, mostrando la reversibilidad del derivado VP 2.51.

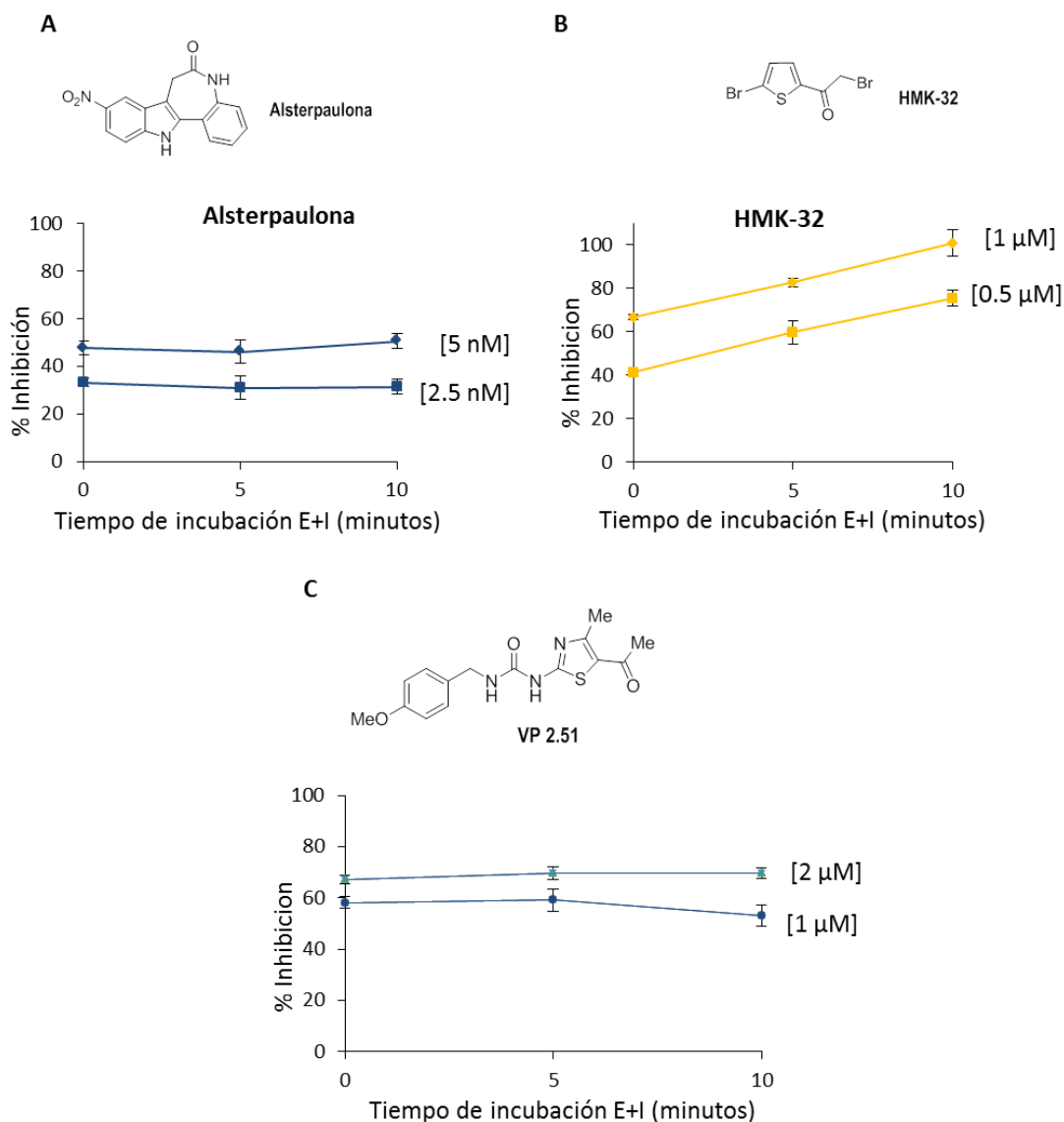


Figura 27: Estudio de la reversibilidad de la unión a la enzima. (A-C) Ensayo de reversibilidad de la Alsterpaulona, HMK-323 y VP2.51.

A continuación se realizó un estudio de competitividad en la inhibición con el ATP. En el ensayo de competición, se mide la actividad inhibitoria de los compuestos a diferentes concentraciones de ATP. Los inhibidores competitivos, cambian su K_M a diferentes concentraciones de la molécula con la que compiten, mientras su V_{max} permanece inalterada (corte coincidente del eje de ordenadas). Por el contrario, un inhibidor no competitivo mantiene constante su K_M (corte coincidente del eje de abscisas) (figura 28). Puede observarse que VP2.51 compite con el ATP, produciéndose

el corte de las diferentes rectas en el eje de ordenadas mientras que el control, el inhibidor no competitivo TDZD-8, presenta el corte en el eje de abscisas, indicando que la K_M es independiente de la concentración de ATP.

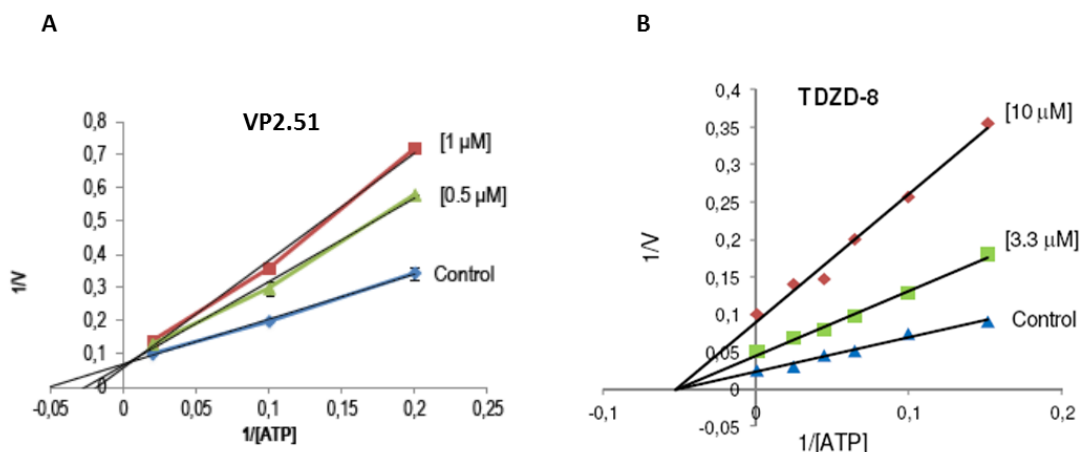


Figura 28: Estudio de competitividad en la inhibición con el ATP. (A-B) Ensayo de competición de TDZD-8, inhibidor de GSK-3 ATP no competitivo y del compuesto ensayado VP2.51 respectivamente.

Finalmente, con el fin de evaluar la selectividad de este inhibidor en diferentes quinasas, se realizó un panel de 50 quinasas humanas estructuralmente relacionadas con GSK-3. El resultado mostró una alta selectividad por la GSK-3, obteniendo una puntuación de selectividad (S) de 0.06 para VP2.51. Otros inhibidores de quinasas que están comercializados, como Sunitinib y Lapatinib presentan un valor de S de 0.57 y 0.010.

2. Estudios *in vitro*: efectos del inhibidor VP2.51 en proliferación, migración y diferenciación de células madre neurales.

Los estudios del efecto de la inhibición de la GSK-3 en la proliferación, migración y diferenciación de células madre neurales se han llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Ana Pérez del Castillo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid. Los

resultados de este estudio fueron publicados en Septiembre del 2012 (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012).

El objetivo principal del estudio fue determinar si la inhibición farmacológica de la vía de la GSK-3 es capaz de promover la neurogénesis *in vitro* e *in vivo*. Para ello utilizaron inhibidores de la GSK-3 de diferente naturaleza. El VP2.51 se utilizó exclusivamente en los estudios *in vitro*. Se muestran a su vez los resultados obtenidos con el inhibidor comercial AR-A014418, y de cuya estructura deriva el VP2.51.

2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación.

Una de las características de las células madre neurales es su capacidad de crecer *in vitro* en forma de esferas (Reynolds and Weiss 1992). Se utilizaron neuroesferas primarias y secundarias. Las neuroesferas primarias se obtuvieron de ratas adultas.

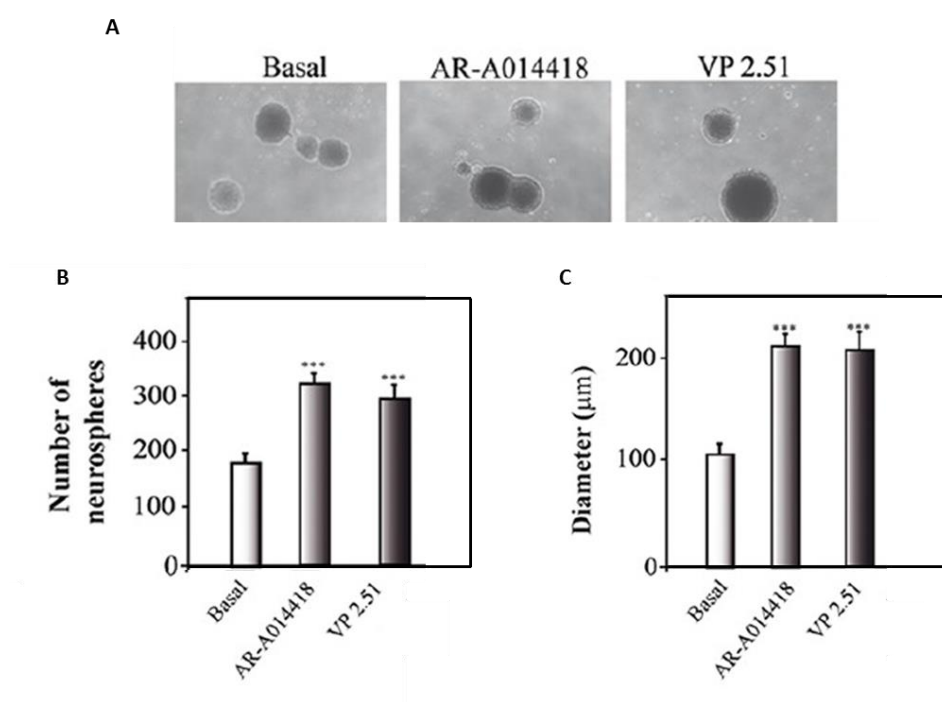


Figura 29: Efecto del VP2.51 en la proliferación de neuroesferas. (A) Foto representativa de neuroesferas, en condiciones basales, tratadas con el inhibidor AR-A014418 y el VP2.51. **(B-C)** Efecto del inhibidor AR-A014418 y el VP2.51 en el número y tamaño de neuroesferas respectivamente. Modificado de (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012).

Se evaluó el efecto del VP2.51 en la formación y/o su tamaño. Como se puede observar en la figura 29, el VP2.51 aumentó el número y el tamaño de las neuroesferas.

2.2 Efecto del VP2.51 en la migración.

Para evaluar el efecto de la GSK-3 en el patrón de la migración celular se evaluó el efecto del fármaco a las 24h de añadir los inhibidores. Como se puede observar en la figura 30, las neuroesferas tratadas con VP2.51 incrementaron significativamente su migración respecto a los controles.

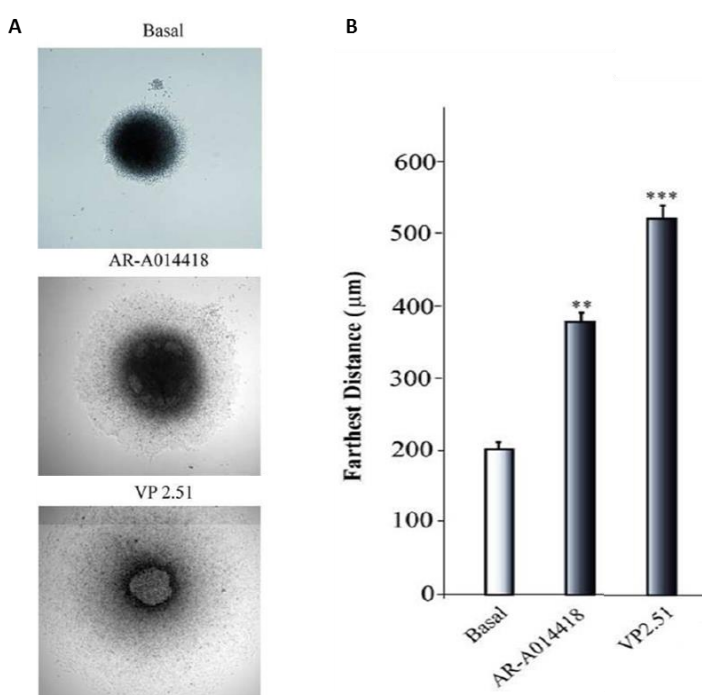


Figura 30: Efecto del VP2.51 en la migración celular. (A) Foto representativa de neuroesferas, en condiciones basales, tratadas con el inhibidor AR-A014418 y el VP2.51. **(B)** Efecto del inhibidor AR-A014418 y el VP2.51 en la migración celular. Modificado de (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012).

2.3 Efecto del VP2.51 en la diferenciación.

Para finalizar, se analizó el efecto de los inhibidores de la GSK-3 en la diferenciación de neuroesferas adheridas. Se utilizó el marcador GFAP para identificar astrocitos y el marcador TuJ para identificar neuronas. Como se observa en la figura 31, el VP2.51 incrementó la diferenciación hacia linaje neuronal.

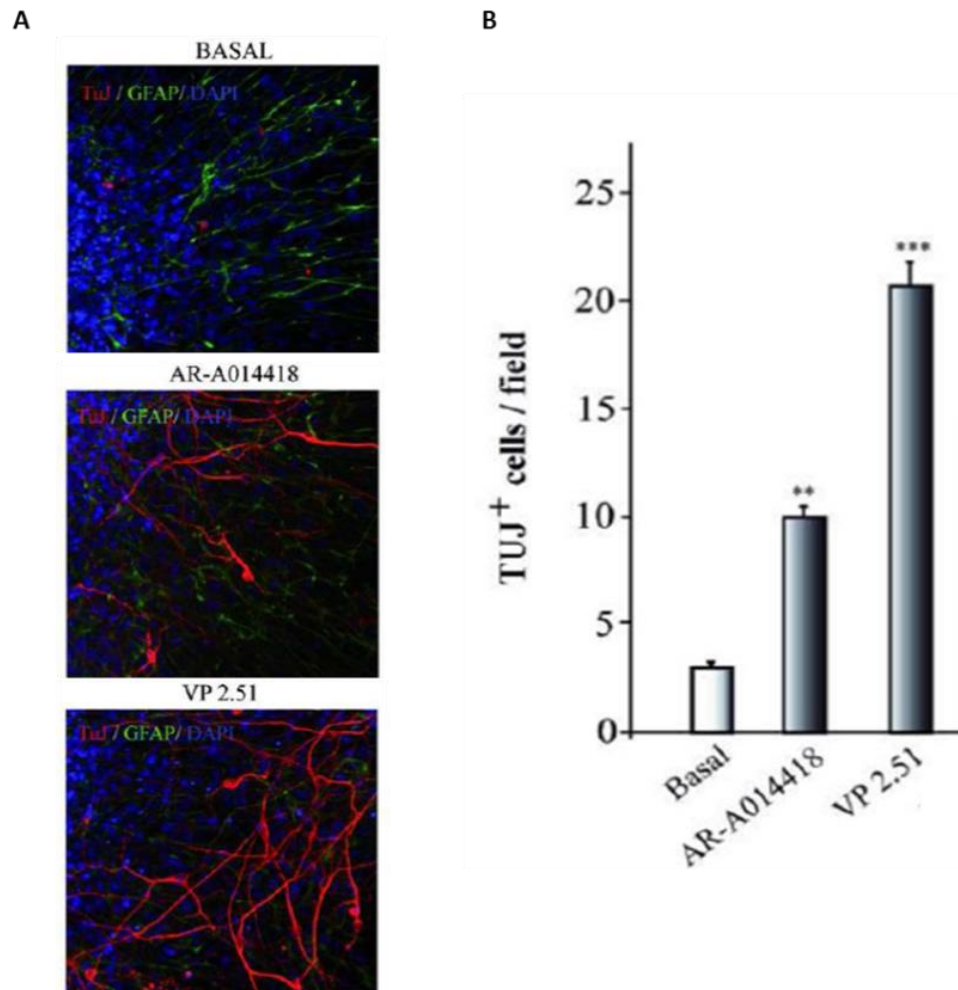


Figura 31: Efecto del VP2.51 en la diferenciación celular. (A) Foto representativa de neuroesferas adheridas, en condiciones basales, tratadas con el inhibidor AR-A014418 y el VP2.51. **(B)** Efecto del inhibidor AR-A014418 y el VP2.51 en la migración celular. Modificado de (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012).

3. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Uno de los mayores obstáculos para el tratamiento de enfermedades del SNC consiste en la penetración del fármaco a dosis terapéuticas a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Pardridge 2009). En la etapa temprana del descubrimiento de

fármacos diseñados para una diana que se encuentre en el SNC, es de vital importancia conocer la permeabilidad de los compuestos a través de la misma.

La determinación de la permeabilidad de la BHE se realizó en el laboratorio de la Dra. Ana Martínez del Instituto de Química Médica del CSIC. Se utilizó un sistema membranas artificiales con metodología PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) (figura 32).

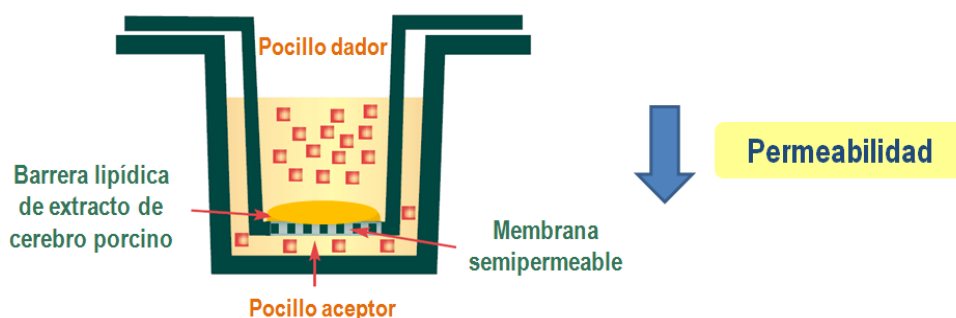


Figura 32: Esquema del experimento de PAMPA.

En cada ensayo se midieron además diez compuestos comerciales de conocida permeabilidad (tanto permeables como impermeables), a partir de los cuales se calcula la permeabilidad de los compuestos ensayados. Los resultados muestran que el VP 2.51 muestra una permeabilidad efectiva compatible con el paso de BHE (Tabla 9).

Comp.	$P_e(10^{-6} \text{ cm s}^{-1})$	Predicción de paso de la BHE
VP2.51	7.6 ± 0.4	SNC ⁺

Tabla 9: Determinación de la permeabilidad de la BHE. SNC⁺ alta probabilidad de paso de la BHE.

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 1:

**Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis
hipocampal adulta.**

El efecto del VP2.51 en un modelo *in vivo* se realizó a raíz de los resultados previos, demostrando que tiene un perfil apropiado en cuanto a su capacidad neurogénica y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios del papel de la GSK-3 β en la neurogénesis hipocampal adulta (AHN). Se ha estudiado el efecto de la supresión de la GSK3- β , de la expresión activa (sin dominio de inhibición Ser9) y de la sobreexpresión en modelos murinos genéticamente modificados. Los resultados apuntan a que la sobreexpresión y la expresión activa (sin el dominio de inhibición) generan fenotipos con una disminución de la capacidad neurogénica. En contra de lo esperado, la supresión de la quinasa no altera la población inmadura DCX⁺, aunque sí disminuye el volumen del giro dentado (Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011, Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013, Kondratiuk, Devijver et al. 2013).

También existen trabajos que estudian el efecto del Litio y el Valproato (VPA), dos inhibidores de la GSK-3 β , en la AHN. La mayoría de los estudios concluyen con un aumento de la proliferación, un aumento de las células inmaduras y un incremento de la diferenciación en el linaje neuronal (Chen, Rajkowska et al. 2000, Hao, Creson et al. 2004, Hsieh, Nakashima et al. 2004, Silva, Mesquita et al. 2008, Wexler, Geschwind et al. 2008, Boku, Nakagawa et al. 2009, Sintoni, Kurtys et al. 2013). Un matiz importante en estos datos es que tanto el Litio como el VPA no son inhibidores exclusivos de la GSK-3 β y está implicados en la regulación de otras vías de señalización (Chen, Rajkowska et al. 2000, Lenox and Wang 2003, Jin, Kovacs et al. 2005). Actualmente solo existe un trabajo en el que se evalúa el efecto de un inhibidor selectivo de la GSK-3 en la AHN y este concluye con un aumento del 75% y 123% de células BrdU tras 7 y 12 días de tratamiento respectivamente. También se observan incrementos cualitativos en las células DCX⁺ y PSA-NCAM (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012).

Por todo ello, en este capítulo nos propusimos evaluar con mayor detalle los efectos del VP2.51, inhibidor ATP-competitivo de la GSK-3, en la proliferación, diferenciación, maduración y supervivencia las células generadas *de novo* en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado (DG) de la formación hipocampal. Además decidimos evaluar la conducta relaciona con la ansiedad con un laberinto en cruz (EPM, del inglés Elevated Plus Maze) (figura 33). Para ello trabajamos con animales jóvenes de 7-8 semanas de edad. El tratamiento se llevó a cabo durante tres semanas y media a una dosis de 2,5 mg/kg.

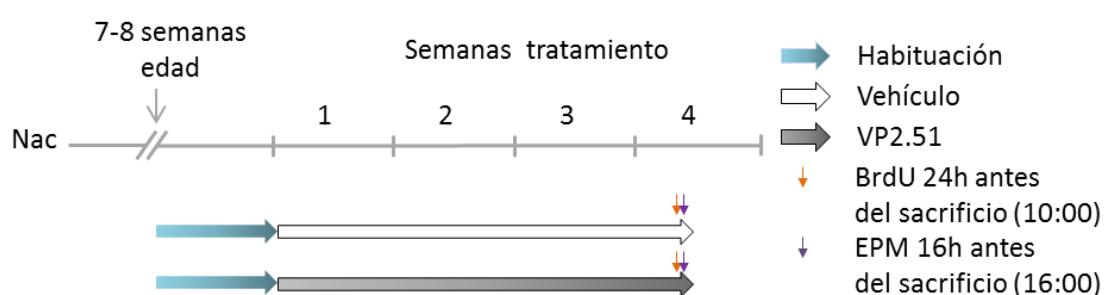


Figura 33: Diseño experimental

1. Peso corporal y ganancia de peso.

La GSK-3 juega un papel principal en el metabolismo energético y su desregulación está implicada en una variedad de desórdenes metabólicos, entre ellos la obesidad y la diabetes tipo 2 (Eldar-Finkelman, Schreyer et al. 1999, Lee, Yang et al. 2013, Datusalia and Sharma 2014). Por tanto se quiso analizar si el fármaco provocaba cambios en el peso de los animales. Se realizó un seguimiento del peso semanalmente de todos los animales desde antes de comenzar el tratamiento hasta su sacrificio.

Como se observa en la gráfica el tratamiento durante tres semanas a la dosis dada no produce cambios significativos ni en el peso corporal ni en la ganancia total (figura 34).

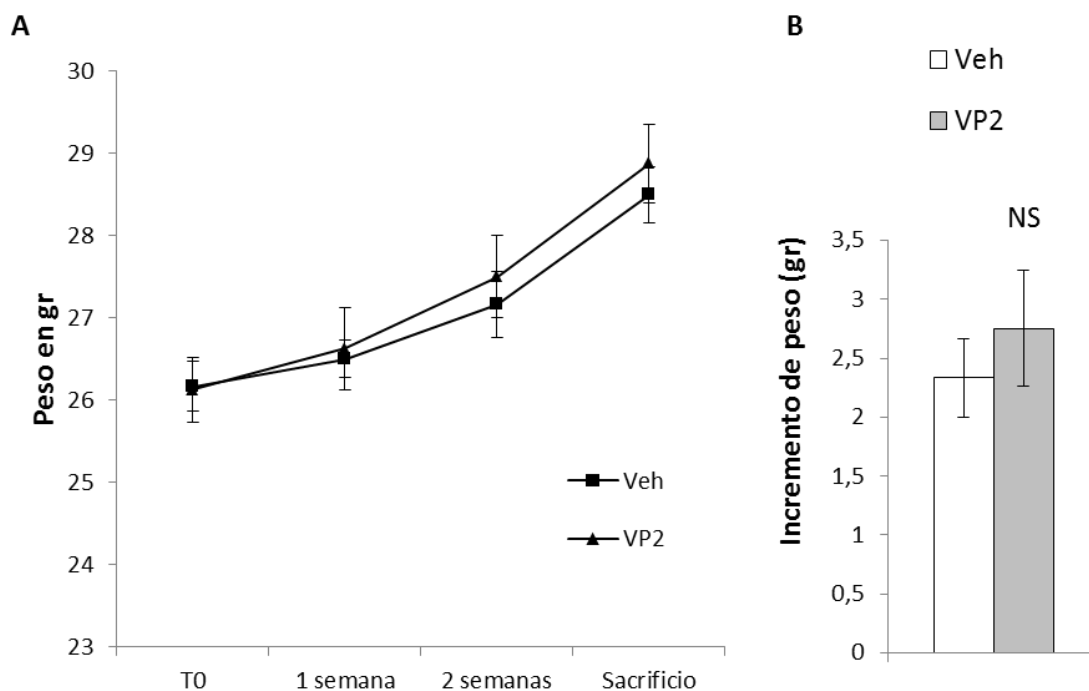


Figura 34: Evaluación del peso corporal y las ganancias de peso de los animales. Los resultados son la media de todos los animales de cada condición experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El VP2.51 no produce alteraciones estadísticamente significativas en el peso de los animales durante tres semanas y media a una dosis de 2.5mg/kg.

2. Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.

En este subapartado estudiamos el efecto del tratamiento con el inhibidor de la GSK-3 en la proliferación, así como la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas *de novo*.

2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación en el giro dentado de la formación hipocampal.

El número de células en proliferación se cuantificó utilizando técnicas estereológicas, a partir de la correspondiente inmunohistoquímica. Se utilizó el anticuerpo anti BrdU (la BrdU se inyectó 24h antes de sacrificio) y la histona 3 fosforilada (pH3 del inglés Phospho Histone 3).

La administración del inhibidor de la GSK-3 durante 3 semanas y media indujo un aumento significativo en torno al 150% en el número total de células BrdU positivas ($P<0,001$) y de un 50% del número total de células pH3 positivas ($P=0,036$). Estos resultados sugieren que el inhibidor de la GSK-3 es proneurogénico, aumentando la proliferación celular (Figura 35).

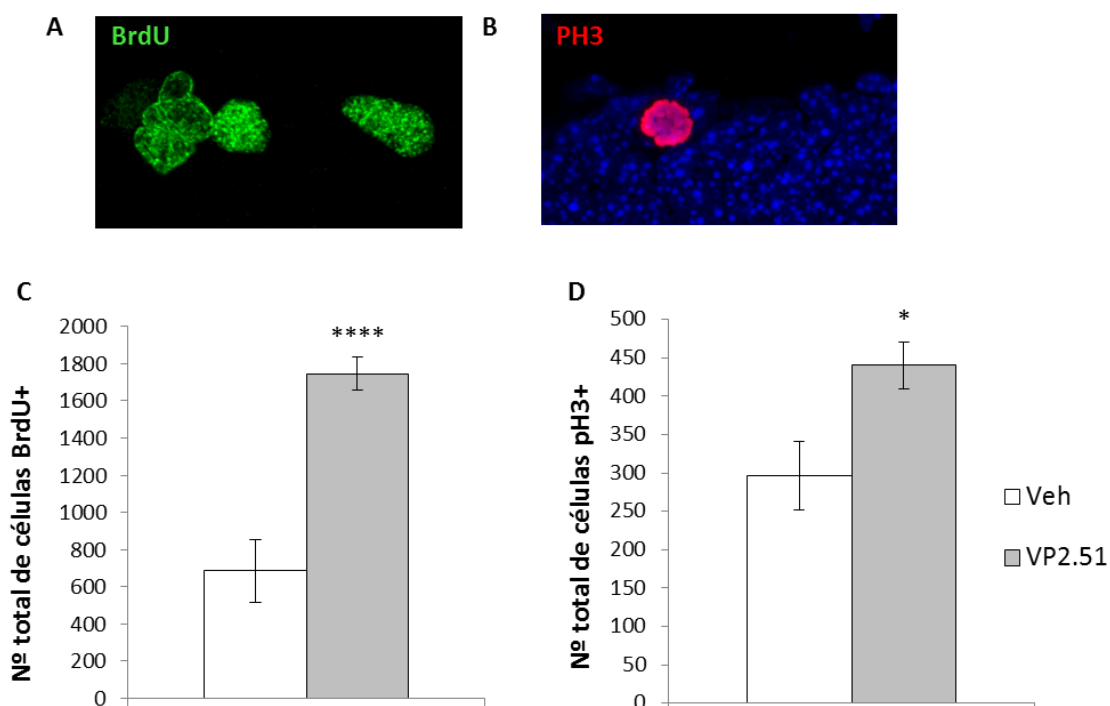


Figura 35: Efecto del VP2.51 en la proliferación en la SGZ. (A y B) Imágenes de microscopia confocal de secciones histológicas inmunoteñidas con BrdU y pH3 respectivamente. **(C)** En el histograma se representa el número total de células BrdU positivas en la SGZ del giro dentado de un hipocampo. **(D)** El histograma representa el número total de células pH3 positivas en la SGZ del giro dentado de un hipocampo. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ y **** $p<0,000$ (t de Student).

2.2 Efecto del VP2.51 en la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas *de novo* en el giro dentado de la formación hipocampal.

Para estudiar el efecto del fármaco en la diferenciación hacia el linaje neuronal, se utilizó el marcador Prox1 y se colocó con la BrdU. En el estudio de la maduración y supervivencia se han utilizado los marcadores DCX y Calret. La DCX es una proteína del citoesqueleto que se localiza en el citoplasma, neuritas y conos de crecimiento. La calretinina es una proteína de unión a calcio y se expresa en todo el cuerpo celular a excepción del axón. Estos dos marcadores tienen un patrón de expresión que nos permiten obtener tres subpoblaciones neurogénicas de células inmaduras: $DCX^+/Calret^-$, $DCX^+/Calret^+$ y $DCX^-/Calret^+$.

Para estudiar el efecto del VP2.51 en la diferenciación se cuantificaron el porcentaje de células $BrdU^+/Prox1^+$ y $BrdU^+/Prox1^-$. Las células dobles $BrdU^+/Prox1^+$ han adquirido un linaje neuronal, mientras que las $BrdU^+/Prox1^-$ no podemos decir que a la fecha del sacrificio tuvieran un linaje neuronal. En las gráficas de la figura 36 se observa como el VP2.51 ha incrementado un 5% el número de células que adquieren linaje neuronal frente a los vehículos ($p=0,019$).

En los estudios de maduración y supervivencia las poblaciones analizadas han sido el número total de células DCX^+ y $Calret^+$ del giro dentado, así como las siguientes subpoblaciones de estas células: $DCX^+/Calret^-$, $DCX^+/Calret^+$ y $DCX^-/Calret^+$. Las células identificadas con estos marcadores abarcan las neuronas inmaduras con un programa temporal que va desde las más inmaduras a las más maduras respectivamente. Hemos encontrado que el fármaco ha sido capaz de aumentar significativamente la población DCX^+ un 77% ($p=0,001$) y la población $Calret^+$ un 82% ($p=0,001$). También ha incrementado significativamente las subpoblaciones $DCX^+/Calret^-$ un 61% ($p=0,001$) y la subpoblación $DCX^+/Calret^+$ un 83% ($p=0,011$) (Figura 37).

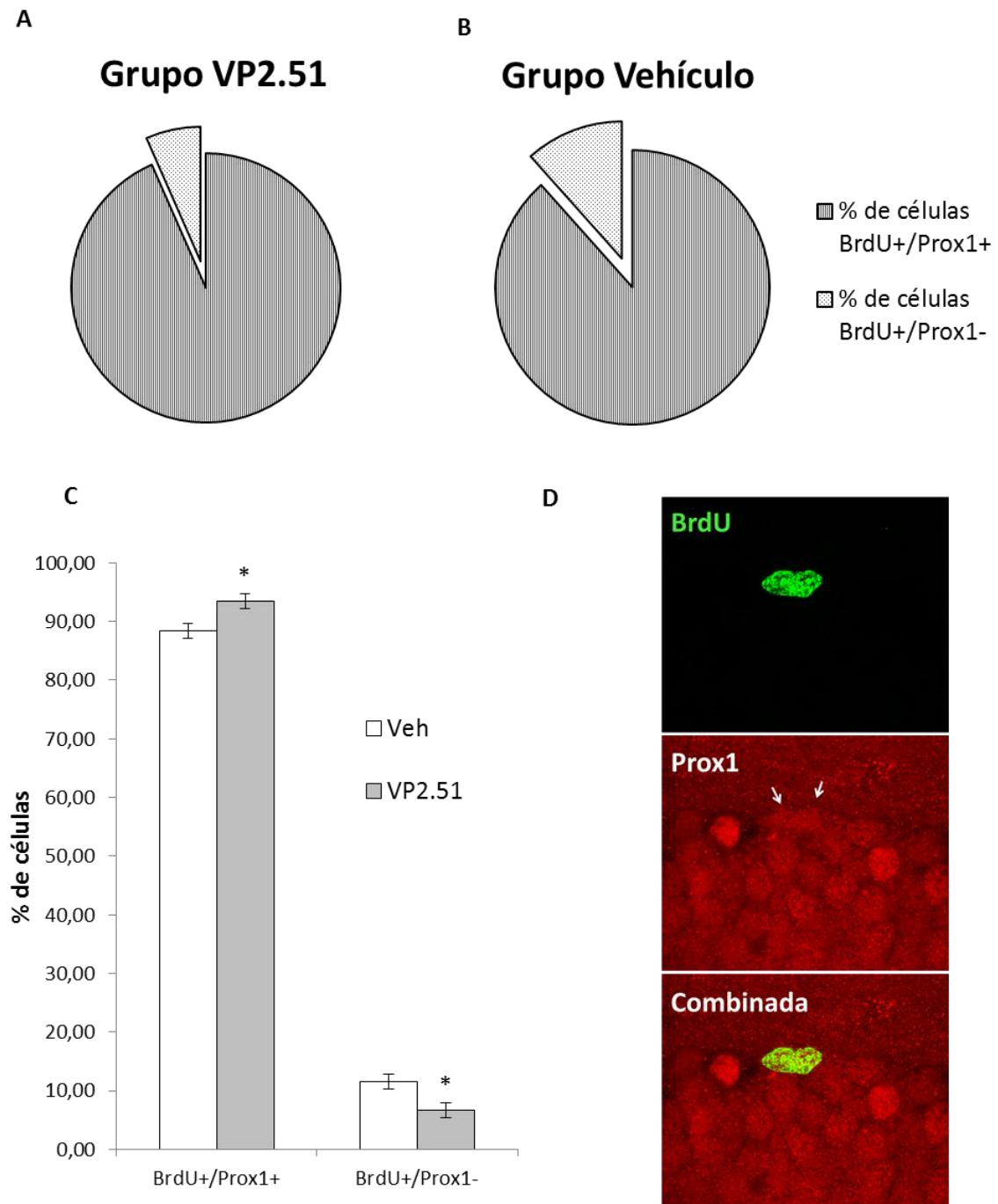


Figura 36: Efecto del VP2.51 en la diferenciación de las células generadas *de novo* en la SGZ. (A y B) Histogramas circulares donde se representan el porcentaje de células BrdU⁺/Prox1⁺ y BrdU⁺/Prox1⁻ de los grupos VP2.51 y vehículo respectivamente. **(C)** En el histograma se compara el porcentaje de células BrdU⁺/Prox1⁺ y BrdU⁺/Prox1⁻ positivas de las dos condiciones experimentales. **(D)** Imagen de microscopia confocal donde puede observarse que las células BrdU⁺ expresan también Prox1. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. *P<0,05 (t de Student).

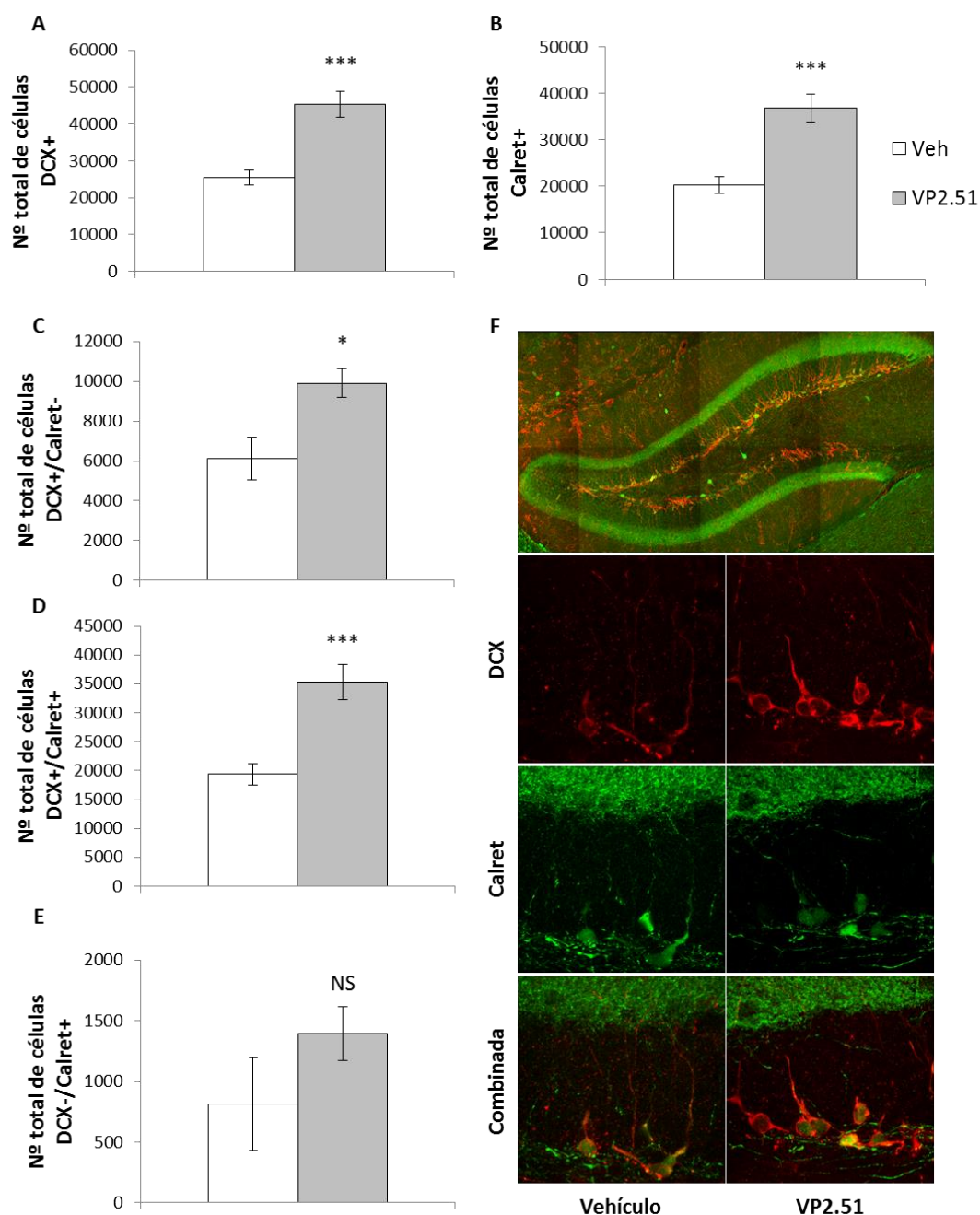


Figura 37: Efecto del VP2.51 en la maduración y supervivencia de las neuronas inmaduras. (A-F) Número total de células de la población total DCX⁺, Calret⁺, así como de las DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺ respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. *p<0,05, ***p<0,001 y NS no significativo (t de Student). **(F)** Composición de fotos de microscopia confocal. La foto superior representa un giro dentado. A continuación se observan imágenes, a mayor aumento, representativas de los grupos vehículo y VP2.51. En rojo las células DCX⁺ y en verde las células Calret⁺.

Conclusiones: El VP2.51 incrementa significativamente la proliferación en el giro dentado, así como incrementa el número de células que adquieren linaje neuronal. Estos efectos no se restringen a la capacidad proliferativa, sino que el fármaco también es capaz de aumentar la supervivencia y/o maduración de las poblaciones inmaduras.

3. Efecto del VP2.51 en conductas relacionadas con la ansiedad.

Parece existir una relación entre la neurogénesis hipocampal adulta y las conductas relacionadas con la ansiedad (Revest, Dupret et al. 2009, Kheirbek, Klemenhagen et al. 2012). Los fármacos ansiolíticos y antidepresivos suelen necesitar una neurogénesis hipocampal intacta para poder ejercer su mecanismo de actuación (Santarelli, Saxe et al. 2003, David, Samuels et al. 2009, Snyder, Soumier et al. 2011). Además se ha observado que algunos fármacos ansiolíticos son proneurogénicos (Guilloux, Mendez-David et al. 2013). Estudios realizados con ratones modificados genéticamente, que carecen del residuo de inhibición, han demostrado tener un fenotipo ansioso comparado con el control (Polter, Beurel et al. 2010). Por estas razones nos planteamos estudiar el efecto del fármaco en conductas relacionadas con la ansiedad. Para ello realizamos la prueba comportamental del laberinto en cruz (EPM).

Como se observa en la figura 38, el fármaco no alteró significativamente ni el tiempo total en los brazos abiertos (A), ni el número de exploraciones en los brazos abiertos (B) ni el número total de entradas en los brazos abiertos. Estos resultados significan que el VP2.51 no indujo un efecto ansiolítico en los animales tratados.

Conclusión: El VP2.51 no induce un efecto ansiolítico en animales controles tratados durante tres semanas a una dosis de 2,5 mg/kg.

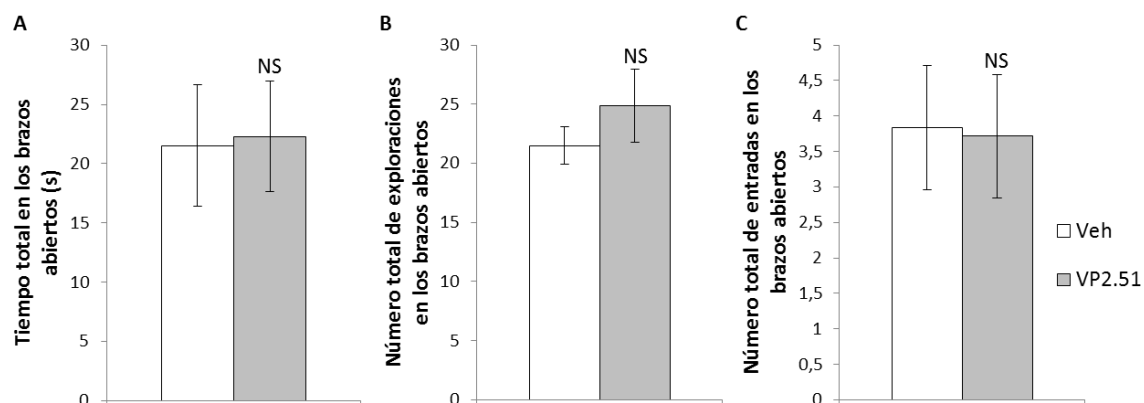


Figura 38: Efecto del VP2.51 en el comportamiento del laberinto elevado en cruz.

(A) Tiempo total en segundos que pasan en los brazos abierto del EPM. **(B)** Número de exploraciones totales que hacen en los brazos abiertos. **(C)** Número de entradas totales que hacen en los brazos abiertos. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 2:

**Efecto crónico del fármaco en conductas
relacionadas con la función hipocampal.**

Validez predictiva.

Una vez confirmado el efecto proneurogénico del fármaco, nos propusimos estudiar sus posibles implicaciones en la conducta. Recordemos que en el capítulo anterior ya se evaluó la conducta relacionada con la ansiedad mediante un EPM (véase Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta. 3. Efecto del VP2.51 en conductas relacionadas con la ansiedad). Se eligieron dos conductas muy relacionadas con formación hipocampal y la neurogénesis hipocampal adulta, como son el aprendizaje espacial y la conducta depresiva.

Para este estudio tuvimos 2 condiciones experimentales en función de la prueba comportamental que se realizó antes del sacrificio. Cada condición experimental tuvo a su vez un grupo vehículo y un grupo tratado con VP2.51 durante tres semanas y media a una dosis de 2,5 mg/kg (figura 39). La N de cada grupo es de 10 ratones C57 machos de 7-8 semanas de edad al comienzo del experimento.

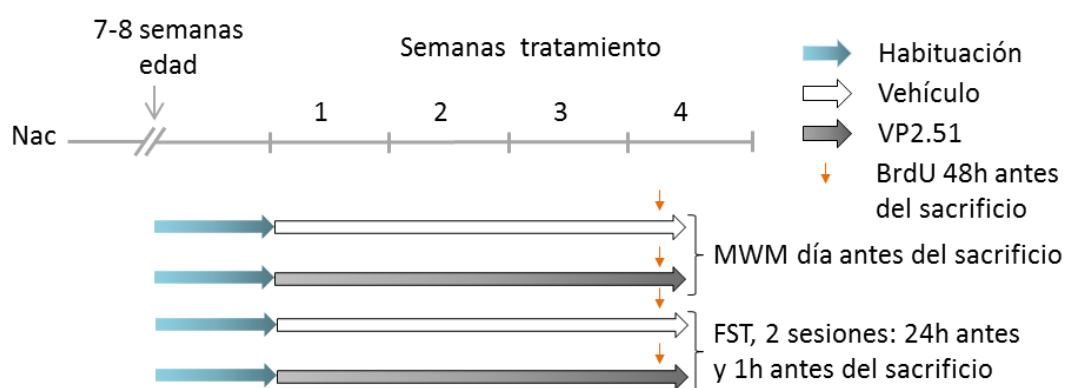


Figura 39: Diseño experimental para estudiar el efecto del VP2.51 en conductas hipocampo-dependientes.

Como era esperable, a tenor de los resultados del experimento del capítulo anterior, los incrementos en peso no vieron alterados por el tratamiento farmacológico (tabla 10).

Grupo	Conducta	T0 (gr)	Semana 1 (gr)	Semana 2 (gr)	Sacrificio (gr)	Incremento peso (gr)
Veh	MWM	23,8 ±0,7	24,9 ±0,8	25,30 ±0,7	27,8 ±0,7	4, ±0,6
	FST	24,9 ±0,6	26,7 ±0,6	27,7 ±0,6	29,1 ±0,7	4,2 ±0,6
VP2.51	MWM	24,7 ±0,5	26,2 ±0,6	27,2 ±0,6	28,5 ±0,7	3,8 ±0,6
	FST	24,6 ±0,7	26, ±0,6	26,9 ±0,6	28,2 ±0,6	3,6 ±0,6

Tabla 10: Peso e incremento de peso de los diferentes grupos experimentales.

Todos los datos se expresan en gr. Los resultados son la media del grupo experimental y el error es la SEM (t de Student).

1. Efecto del VP2.51 en el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo.

Se ha reportado la importancia de la actividad de GSK-3 β mediando la interacción entre las dos principales formas de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés Long Term Depression). Es más, la actividad de la GSK-3 β se incrementa durante la LTD y se inhibe en la LTP (Peineau, Taghibiglou et al. 2007).

Poe ello, en este subapartado hemos testado el efecto del fármaco en el laberinto acuático (MWM) de un día con el fin de observar si el efecto proneurogénico/alteración de la actividad de la GSK-3 del VP2.51 tiene alteraciones significativas en la tarea de aprendizaje espacial y si existía un correlato histológico-

conductual. Para este experimento realizamos un MWM de un día (para más detalles véase material y métodos 2.7).

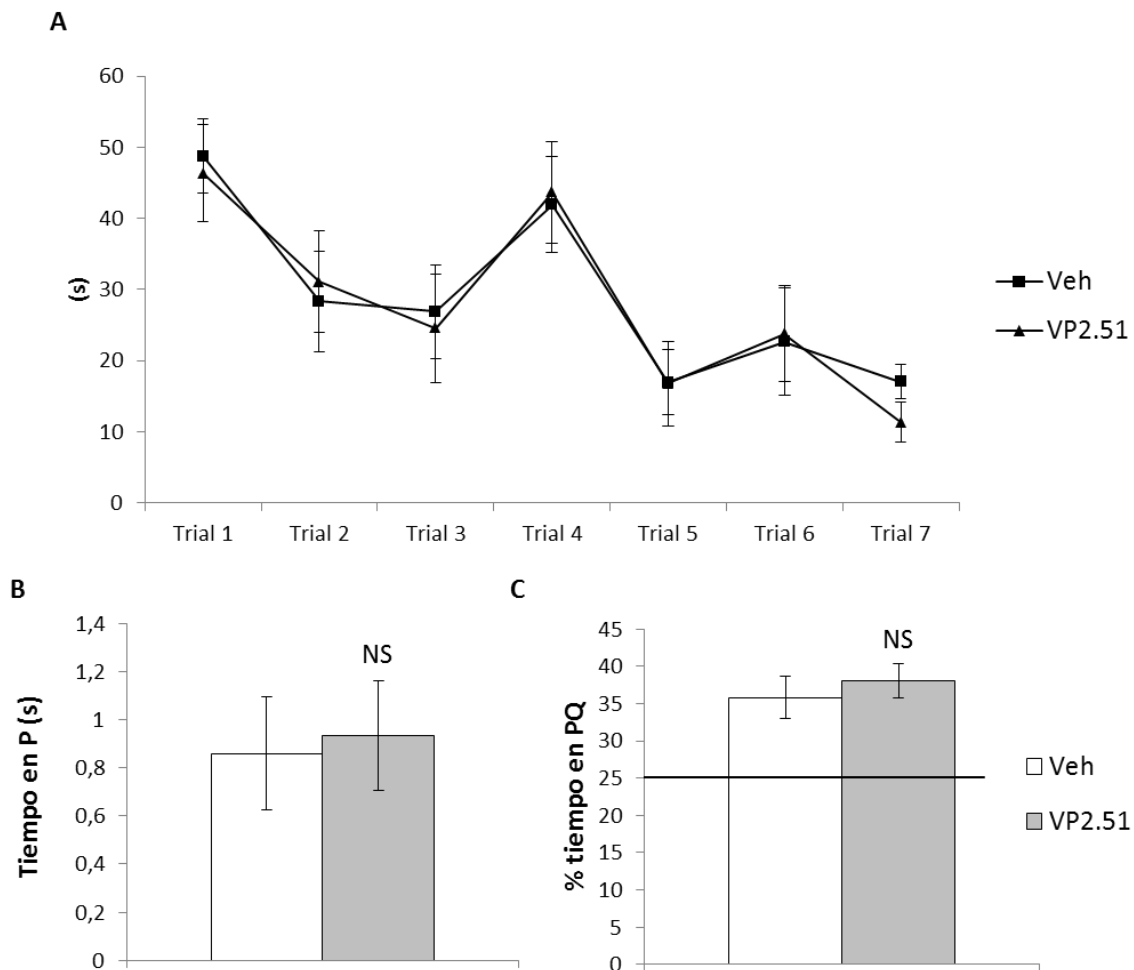


Figura 40: Efecto del VP2.51 en la memoria espacial hipocampo-dependiente. (A) Curva de aprendizaje de un MWM de un día con 7 ensayos. **(B-C)** Resultados de la sonda, el tiempo que pasan por encima de la plataforma (P) y el porcentaje del tiempo que pasan en el cuadrante de la plataforma (PQ) respectivamente. La línea negra en el histograma (C) representa el 25% del tiempo. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

En la figura 40 se puede apreciar que el fármaco no mejoró la memoria espacial en animales controles tratados durante 3 semanas y media a una dosis de 2,5 mg/kg. Como modo de testar el aprendizaje de los animales, puede observarse en el

histograma C de la Figura 40 que ambos grupos experimentales pasan más del tiempo del puramente probabilístico (25%) en el cuadrante de la plataforma. Todos los animales excepto uno de cada grupo experimental pasó al menos una vez por la posición virtual de la plataforma durante la sonda (datos no mostrados).

Al no encontrar efectos en la realización de la tarea de aprendizaje espacial se decidió no evaluar la histología.

Conclusión: El VP2.51 no tiene un efecto procognitivo en la prueba del laberinto acuático en animales controles tratados durante tres semanas a una dosis de 2,5mg/kg.

2. Efecto del VP2.51 en la desesperanza aprendida.

La GSK-3 β se ha visto implicada en el mecanismo de acción de algunos estabilizadores del estado de ánimo como son el Valproato y el Litio (Chen, Huang et al. 1999, Li, Bijur et al. 2002) que han sido utilizados como tratamientos de trastornos psiquiátricos como el trastorno bipolar (Jope 1999). Es más, la GSK-3 β disfuncional parece estar involucrada en el trastorno de depresión mayor (MDD) (Jope and Roh 2006, Jope 2011). Varios estudios con inhibidores de diferente naturaleza de la GSK-3 han demostrado tener una buena eficacia antidepressiva en la prueba de nado forzado (FST del inglés forced swimming test) (Gould, Einat et al. 2004, Kaidanovich-Beilin, Milman et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008, Du, Wei et al. 2010).

2.1 ¿Es un antidepressivo potencial? Test de validez predictiva.

Por las razones anteriormente expuestas nos preguntamos si nuestro fármaco podía tener algún efecto antidepressivo potencial. Realizamos la prueba FST, que está

validado como buen indicador de la eficacia antidepressiva de un compuesto. La medida de eficacia la determina el tiempo de inmovilidad. Cuanto menor sea el tiempo de inmovilidad, mayor es la eficacia antidepressiva. Como se puede observar en la figura 41, el fármaco fue capaz de disminuir el tiempo de inmovilidad un 17,5% ($p=0,024$).

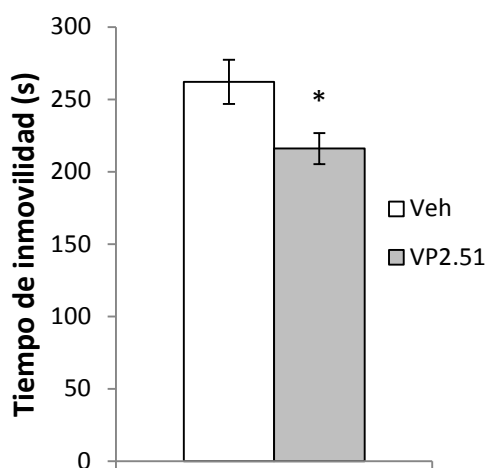


Figura 41: Tiempo de inmovilidad en el FTS. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ (t de Student).

Conclusión: El VP2.51 cumple buenas características potenciales de un fármaco antidepressivo en animales controles tratados durante tres semanas y una dosis de 2,5mg/kg.

2.2 Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.

En el 2000 se describió por primera vez la relación entre los fármacos antidepressivos y la neurogénesis hipocampal adulta (Malberg, Eisch et al. 2000). El trabajo concluyó que el tratamiento crónico con antidepressivos, y no el agudo, aumenta la proliferación en la SGZ y la neurogénesis (Malberg, Eisch et al. 2000). Estos resultados han sido ampliamente reproducidos (Manev, Uz et al. 2001, Santarelli, Saxe et al. 2003, Kodama, Fujioka et al. 2004, Encinas, Vaahtokari et al. 2006, Huang and Herbert 2006, Marcussen, Flagstad et al. 2008).

Sin embargo, nosotros desconocemos la existencia de algún trabajo que relacione el efecto antidepresivo de los inhibidores de la GSK-3 con un efecto proneurogénico. Por este motivo nos propusimos estudiar si el efecto antidepresivo del fármaco correlacionaba con un aumento de la neurogénesis hipocampal adulta.

2.2.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación/supervivencia de la SGZ del Giro Dentado.

En este subapartado estudiamos el efecto del fármaco en la proliferación y supervivencia de estas células nacidas 48h antes del sacrificio y en animales que realizaron un FST 24h antes del sacrificio.

Como se puede ver en la figura 42 se observó un aumento significativo del 33% en el número de células BrdU en los animales tratados con el VP2.51 ($p=0.012$).

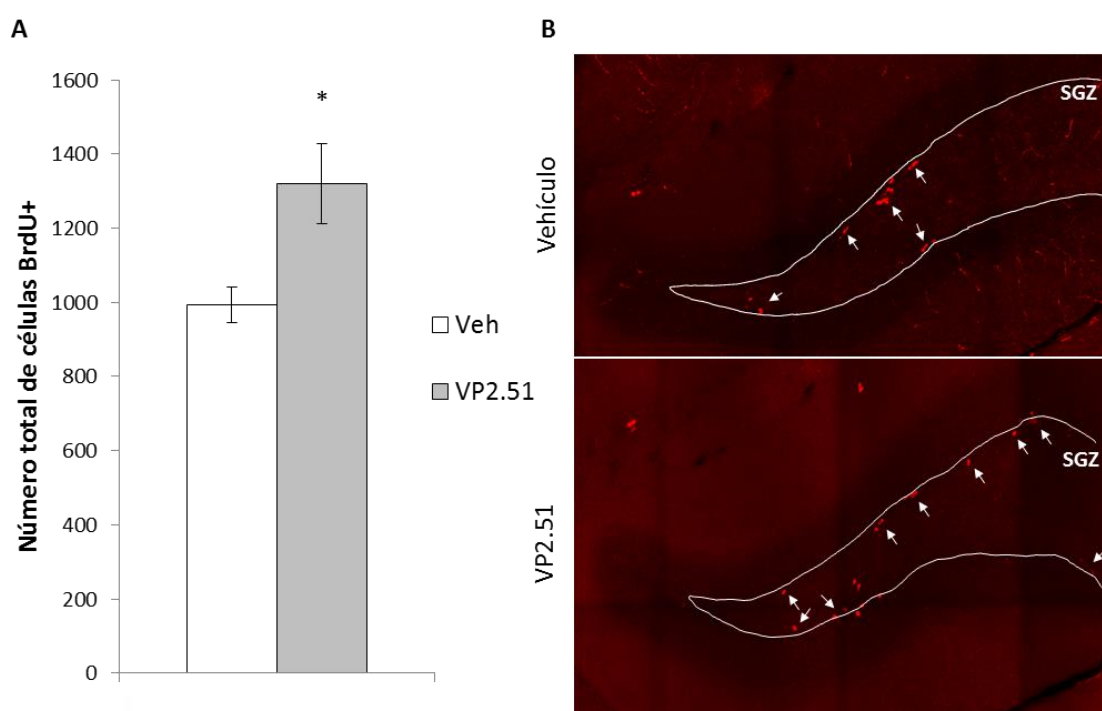


Figura 42: Efecto del VP2.51 en la proliferación. (A) Número total de células BrdU. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ (t de Student). **(B)** Imágenes de microscopía confocal representativas de un Giro Dentado. Se ha representado con una línea blanca la SGZ. Las flechas blancas señalan las células BrdU⁺ en rojo.

2.2.2 Efecto del VP2.51 en la supervivencia de las poblaciones inmaduras.

Para estudiar el efecto del fármaco en las poblaciones de neuronas inmaduras se realizó una inmunohistoquímica de los marcadores de neuronas inmaduras DCX y Calret.

Como se puede observar en la figura 43 el protocolo del FST eliminó el aumento de la supervivencia y/o diferenciación que observamos en el capítulo anterior.

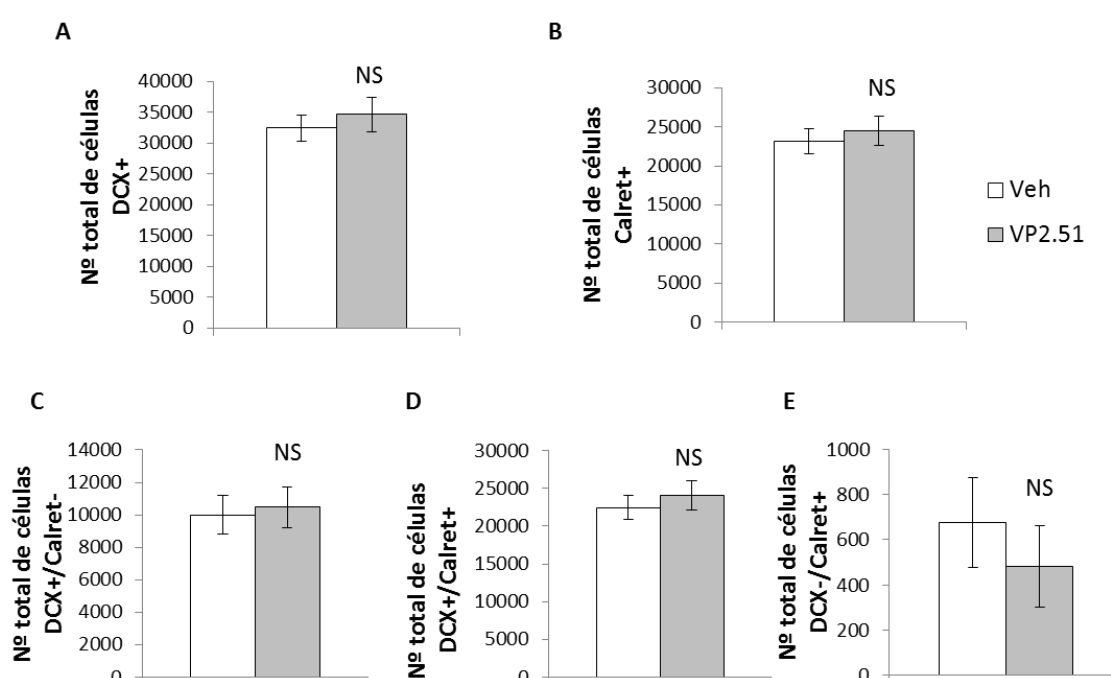


Figura 43: Efecto del VP2.51 en las poblaciones inmaduras tras la prueba del FST.

(A) Número total de células de la población DCX⁺. (B) Número total de células de la población Calret⁺, (C) Número total de células de la subpoblación DCX⁺/Calret⁻. (D) Número total de células de la subpoblación DCX⁺/Calret⁺. (E) Número total de células de la subpoblación DCX⁻/Calret⁺. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Conclusiones: Los animales tratados con VP2.51 tienen un aumento significativo de la proliferación/supervivencia de las células nacidas 48h

antes del sacrificio. Sin embargo el efecto proneurogénico en las subpoblaciones inmaduras parece disiparse tras el protocolo del FST.

2.2.3 ¿Existe un correlato histológico-conductual en el efecto antidepresivo del VP2.51?

Finalmente, y para concluir este capítulo nos propusimos estudiar si existía algún correlato entre las diferentes subpoblaciones y la respuesta ante el FST.

En primer lugar correlacionamos el número de células BrdU⁺ con el tiempo de inmovilidad. Como se puede observar en la figura 44, no advertimos una correlación significativa (cuyo umbral nosotros hemos situado en una $R^2 > 0,8$). Para evaluar si este correlato dependía de la condición experimental, correlacionamos los animales de cada grupo por separado. De nuevo no obtuvimos correlaciones significativas entre el número de células BrdU⁺ y el tiempo de inmovilidad (figura 44).

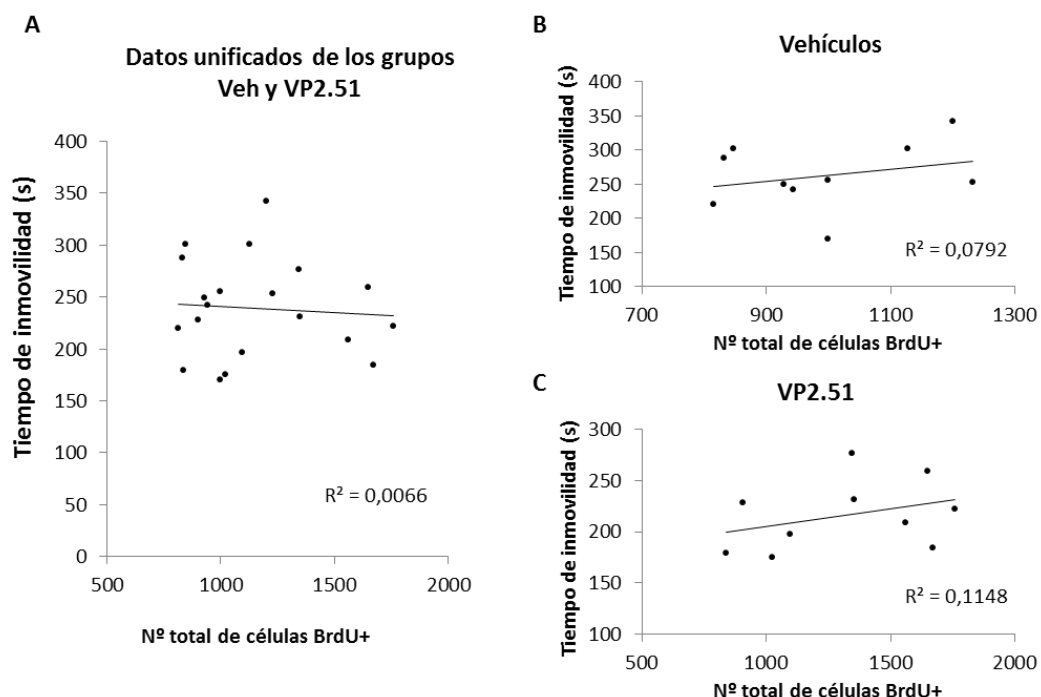


Figura 44: Correlatos entre el número de células BrdU⁺ y el tiempo de inmovilidad en el FST. (A) Correlación de todos los datos agrupados. (B) Correlación del grupo vehículo. (C) Correlación del grupo VP2.51. Como se observa ninguna de las correlaciones fue estadísticamente significativa.

Con el mismo fin, evaluamos el efecto de las poblaciones inmaduras y el tiempo de inmovilidad. Se realizaron las correlaciones de todos los animales unificados y separados por grupo experimental. Como se observa en la tabla 11, tampoco se observaron correlatos significativos entre las diferentes subpoblaciones y el tiempo de inmovilidad.

Grupo	Subpoblación	Coefficiente de determinación (R^2)	Significación
Agrupados Veh y VP2.51	Nº total DCX ⁺ /CLR-	0,0274	NS
	Nº total DCX ⁺ /CLR ⁺	0,0641	NS
	Nº total DCX-/CLR ⁺	0,0419	NS
	Nº total DCX ⁺	0,0104	NS
	Nº total CLR ⁺	0,0569	NS
Veh	Nº total DCX ⁺ /CLR-	0,0651	NS
	Nº total DCX ⁺ /CLR ⁺	0,057	NS
	Nº total DCX-/CLR ⁺	0,0139	NS
	Nº total DCX ⁺	0,0012	NS
	Nº total CLR ⁺	0,0663	NS
VP2.51	Nº total DCX ⁺ /CLR-	0,0431	NS
	Nº total DCX ⁺ /CLR ⁺	0,0373	NS
	Nº total DCX-/CLR ⁺	0,3058	NS
	Nº total DCX ⁺	0,0011	NS
	Nº total CLR ⁺	0,0217	NS

Tabla 11: Correlato histológico-conductual de las subpoblaciones inmaduras y el tiempo de inmovilidad. Ninguna de las correlaciones fue estadísticamente significativa (NS).

Conclusiones: No se ha observado un correlato histológico conductual en ninguno de los estudios realizados. No se han observado correlatos

significativos entre el número de células BrdU⁺ y el tiempo de inmovilidad en el FST. Del mismo modo no se han observado correlatos significativos entre las diferentes subpoblaciones inmaduras y el tiempo de inmovilidad en el FST.

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 3:

**Efecto terapéutico del VP2.51 en la conducta
depresiva.**

La eficiencia antidepressiva de los inhibidores de la GSK-3 se ha estudiado con diferentes clases de inhibidores, modelos animales y diferentes diseños temporales (Gould, Einat et al. 2004, Kaidanovich-Beilin, Milman et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008). Aunque hay un consenso sobre el efecto antidepressivo de estas moléculas, no existe ningún trabajo que evalúe el efecto de estos fármacos en animales previamente depresivos y/o estresados con un FST modificado (véase material y métodos 2.2 Prueba de la natación forzada).

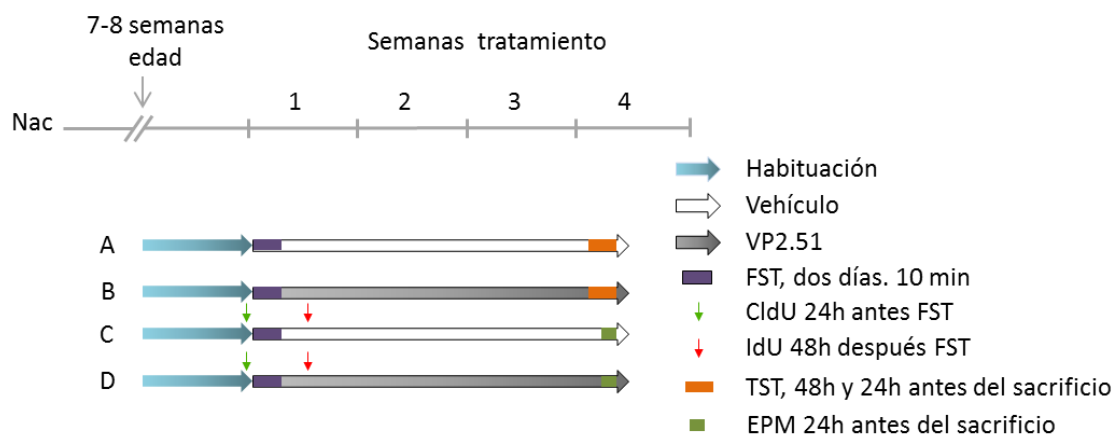


Figura 45: Diseño experimental. (A y B) Grupos experimentales para testar la recuperación con TST. (C y D) Grupos experimentales para evaluar histológicamente dos subpoblaciones marcadas antes (CldU, flecha verde) y después del FST (IdU, flecha roja) y si existen subpoblaciones que responden de manera específica a la administración del fármaco.

En este capítulo se evaluó si el efecto proneurogénico y antidepressivo del fármaco afecta a la recuperación de animales previamente estresados y/o depresivos y si existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas. Para ello dispusimos de 40 animales C57/BL6J. Al inicio se indujo en todos los animales una desesperanza aprendida con un protocolo del FST modificado y se trataron durante 3 semanas y media con el vehículo o el VP2.51. Estos 40 animales se dividieron en 4 grupos experimentales (N=10). Se utilizaron dos grupos (Figura 45, grupos A y B) para testar la recuperación con una prueba de suspensión por la cola (TST, del inglés Tail Suspension Test). Los otros dos grupos (Figura 45, C y D) nos permitieron evaluar los efectos del fármaco en dos subpoblaciones marcadas antes y después del FST y si

existen subpoblaciones que responden de manera específica a la administración del fármaco. Estos dos grupos experimentales realizaron un EPM antes del sacrificio.

Durante el tratamiento se evaluó el incremento del peso y de nuevo no se vieron diferencias significativas entre el grupo experimental vehículo y VP2.51 (tabla 12)

Grupo	Conducta	T0 (gr)	Semana 1 (gr)	Semana 2 (gr)	Sacrificio (gr)	Incremento peso (gr)
Veh	TST	21,5 ±0,3	23,20 ±0,3	25,10 ±0,5	25,70 ±0,4	4,20 ±0,3
	Histología	21,9 ±0,3	23,1 ±0,4	25 ±0,4	25,5 ±0,3	3,6 ±0,2
VP2.51	TST	21 ±0,3	22,7 ±0,4	24 ±0,6	25,1 ±0,4	4,1 ±0,4
	Histología	21,9 ±0,3	22,8 ±0,3	23,90 ±0,3	25,5 ±0,4	3,50 ±0,4

Tabla 12: Peso e incremento de peso de los diferentes grupos experimentales.

Todos los datos se expresan en gr. Los resultados son la media del grupo experimental y el error es la SEM.

1. Efecto del VP2.51 en la recuperación de la conducta relacionada con ansiedad/depresión.

La pre-exposición a un mismo tipo de estrés (un primer FST) genera una respuesta exacerbada en un segundo FST, induciendo un aumento del tiempo de inmovilidad (desesperanza aprendida). Este fenómeno se ha observado en diferentes modelos animales y a diferentes intervalos de tiempo entre el primer estrés y el segundo (Borsini, Lecci et al. 1989, Craft, Kostick et al. 2010, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011). Estos datos no son sorprendentes ya que la exposición a un FST eleva robustamente la corticosterona (Peeters and Broekkamp 1994, Connor, Kelly et al. 1997, Connor,

Kelliher et al. 2000). Los inhibidores de la GSK-3 son capaces de inhibir la respuesta de la corticosterona (Sun and Chen 2008). Estudios con el glucocorticoide sintético dexametasona (DEX), han revelado que los inhibidores de la GSK-3 son capaces de reducir y/o recuperar los efectos de la DEX (Evenson, Fareed et al. 2005, Galliher-Beckley, Williams et al. 2008, Boku, Nakagawa et al. 2009, Wang, Ko et al. 2009, Garza, Guo et al. 2012, Boku, Nakagawa et al. 2013). Sin embargo no existe ningún trabajo que evalúe el efecto de los inhibidores de la GSK-3 en animales estresados y/o depresivos por la exposición a un estrés y si es posible una recuperación por el tratamiento.

Por los motivos recién mencionados, nos propusimos estudiar si el estrés y/o la desesperanza aprendida generados durante una exposición a un FST modificado, se podría revertir con el inhibidor de la GSK-3, VP2.51. Para ello intensificamos el protocolo de FST, incrementando el tiempo de las sesiones de 6 a 10 minutos. Para evaluar el efecto del fármaco se realizó un TST. Esta prueba es un homólogo del FST (ver material y métodos 2.2.2 Evaluación del efecto antidepresivo del fármaco con el FST.), y se cuantificó el tiempo de inmovilidad. Cuanto menor sea el tiempo de inmovilidad, menos estresado y/o depresivo está el animal y por tanto, mejor es la recuperación. Previamente se realizó una puesta a punto del protocolo, donde se observó que la pre-exposición al FST inducía una desesperanza aprendida respecto a los animales controles.

Como se puede ver en la figura 46, el fármaco mejoró significativamente la recuperación de los animales estresados y/o depresivos ($p=0,047$).

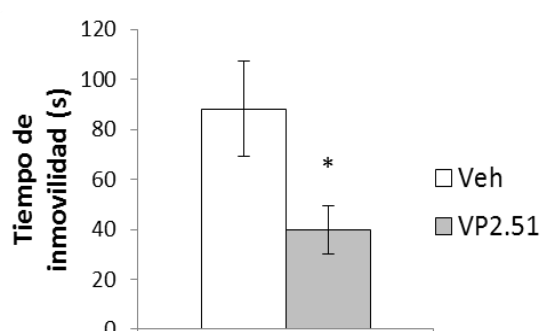


Figura 46: Evaluación de la recuperación. Se representa el tiempo de inmovilidad del día 1 del TST. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ (t de Student).

Conclusión: El VP2.51 es capaz de inducir una recuperación en animales estresados y/o depresivos tratados durante tres semanas y una dosis de 2,5 mg/kg.

2. Efecto del VP2.51 en la conducta relacionada con la ansiedad.

Como ya comentamos, el FST genera un comportamiento de tipo depresivo y/o ansioso. En este sub-apartado evaluamos el efecto del VP2.51 en la conducta relacionada con la ansiedad. Para ello realizamos un EPM 24h antes del sacrificio. Como se puede observar en la figura 47 el VP2.51 no modificó significativamente el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos, ni en los brazos cerrados ($p=0,071$). Sin embargo se registró un aumento significativo del tiempo que pasaron los animales tratados con VP2.51 en la región central del laberinto en cruz ($p=0,046$).

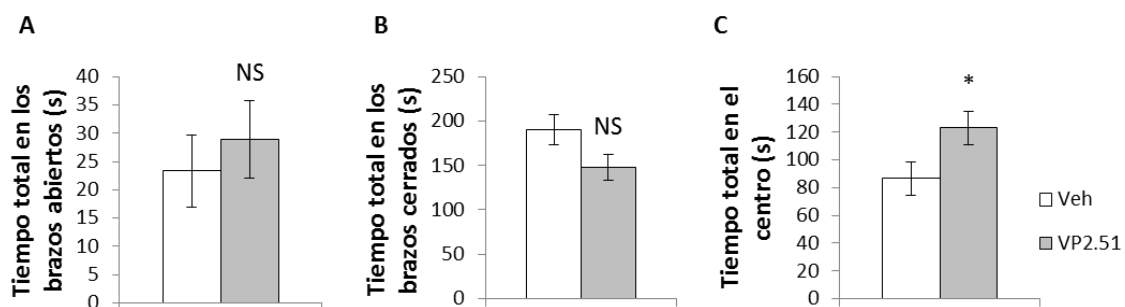


Figura 47: Evaluación de la conducta de tipo ansiosa. (A-C) Efecto del VP2.51 en el tiempo total que los animales permanecieron en los brazos abiertos, brazos cerrados y en el centro respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p < 0,05$ y NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El VP2.51 no modificó significativamente el tiempo en los brazos abiertos ni en los brazos cerrados. Sin embargo si aumentó significativamente el tiempo en el centro del laberinto.

3. Efecto del VP2.51 en neurogénesis hipocampal adulta, ¿Existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas?

Los animales tratados con el VP2.51 obtuvieron una mejor calificación en el TST. Este resultado parece apuntar a que existe una vía de actuación común entre el elemento estresante y/o inductor de una desesperanza aprendida y el fármaco. En este contexto el análisis de los cambios en el cerebro, en particular la neurogénesis hipocampal adulta, resulta de especial relevancia.

Por esta razón analizamos, en este modelo experimental, si el fármaco tiene efectos específicos en subpoblaciones neurogénicas de distinta edad y estado de maduración.

3.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación.

En los estudios previos con animales normales, el tratamiento con el VP2.51 indujo un aumento de la proliferación. En este sub-apartado estudiamos el efecto del fármaco en la proliferación de animales previamente estresados y/o depresivos. Para ello utilizamos el marcador de células en división pH3.

Como se puede observar en la figura 48, el VP2.51 tuvo un efecto proneurogénico, aumentando la proliferación, en la SGZ un 33% ($p=0,001$).

El hipocampo no es una región cerebral homogénea, existiendo suficiente evidencia que avala una disociación funcional en el eje dorso-ventral. La sub-región dorsal está más implicada en procesos de memoria y aprendizaje (Jung, Wiener et al. 1994, Hock and Bunsey 1998, Bannerman, Yee et al. 1999, Pothuizen, Zhang et al. 2004, Klur, Muller et al. 2009, McHugh, Fillenz et al. 2011), mientras que la sub-región

ventral está más involucrada en los comportamientos emocionales, como la ansiedad, el miedo y depresión (Kjelstrup, Tuvnes et al. 2002, Degroot and Treit 2004, Trivedi and Coover 2004, Hunsaker and Kesner 2008, McHugh, Fillenz et al. 2011).

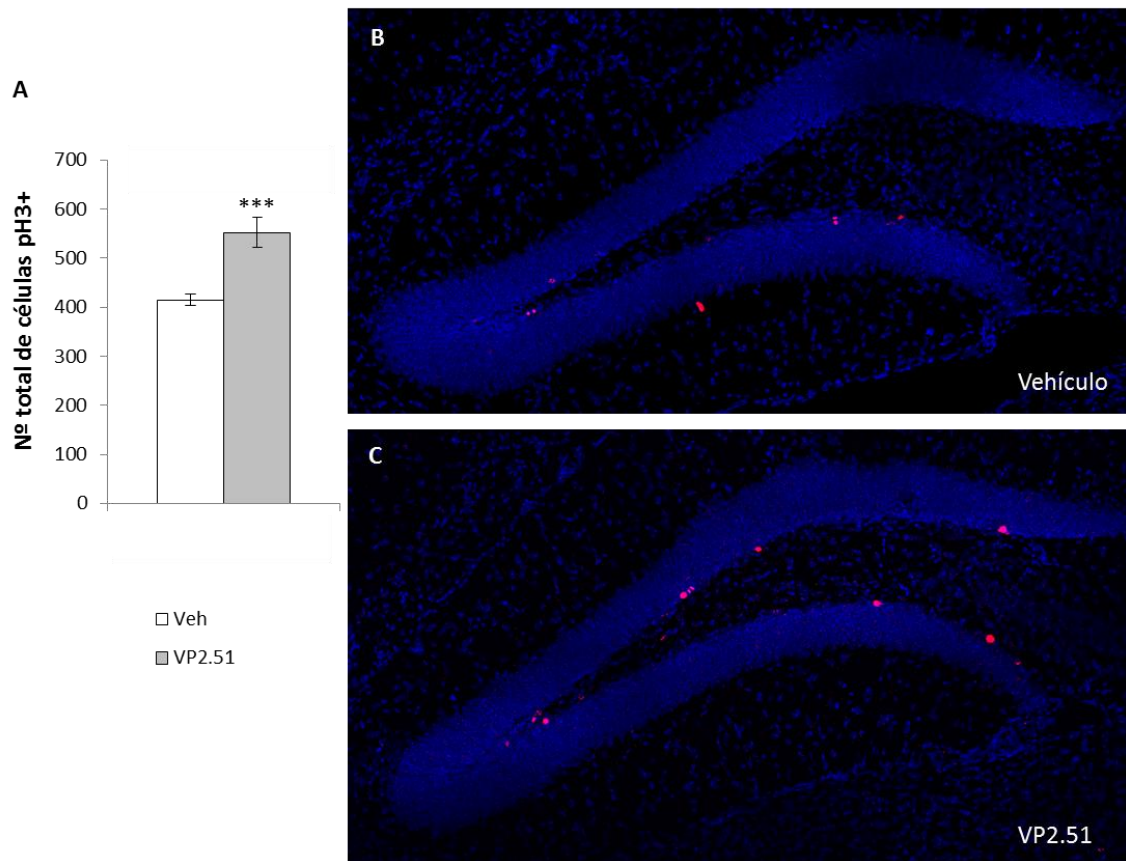


Figura 48: Efecto del VP2.51 en la proliferación celular de la SGZ. (A) Número total de células pH3⁺. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. ***p<0,001 (t de Student). **(B-C)** Imagen de microscopia confocal de un giro dentado completo de un animal tratado con vehículo y VP2.51 respectivamente. Obsérvese en rojo las células pH3⁺.

Por estos motivos, nos propusimos estudiar si el fármaco tenía efectos específicos en la subregión ventral.

Como se observa en la figura 49, este incremento fue específico de la sub-región ventral (p<0,001).

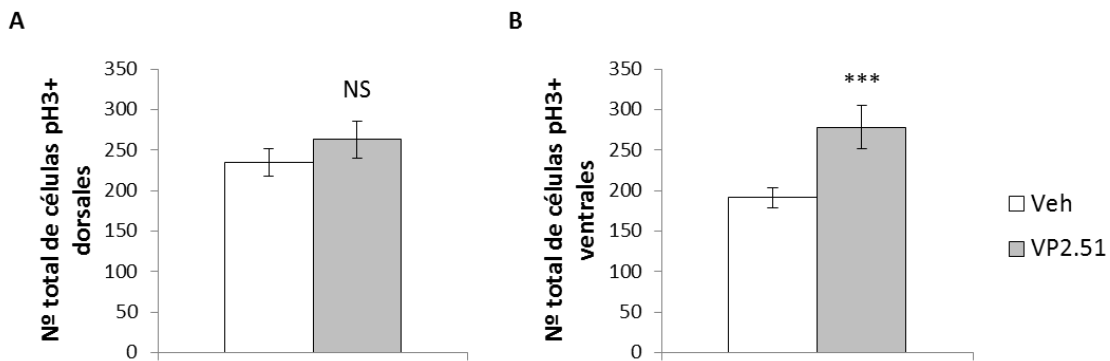


Figura 49: Efecto del VP2.51 en la proliferación celular de las sub-regiones hipocámpales dorsales y ventrales. (A-B) Número total de células pH3⁺ en la subregión dorsal y ventral respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. ***p<0,001 y NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El VP2.51 aumentó significativamente la proliferación en el giro dentado. El estudio por sub-regiones demostró que este incremento se produjo de manera específica en la sub-región ventral.

3.2 Efecto del FST en la proliferación y/o supervivencia de las células generadas 24 horas antes y 48 horas después del FST. ¿Son estas células sensibles al tratamiento con el VP2.51?

Para estudiar las células generadas 24h antes y 48h después del FST, se inyectaron los análogos de timidina CldU e IdU. Estos análogos tienen la ventaja que nos permiten estudiar, en un mismo animal, la supervivencia de células nacidas en fechas distintas. En este experimento nos interesó evaluar el número total de células CldU⁺, generadas 24h antes del FST y el número total de células IdU⁺, generadas 48h después del FST y tras 3 días de tratamiento con el vehículo o el VP2.51. Como se observa en la figura 50, el FST disminuyó significativamente la supervivencia de las células nacidas 24 h antes del FST, tanto en el grupo vehículo como el grupo VP2.51 (p=0,001 y p=0,012).

respectivamente). Sin embargo el tratamiento no fue suficiente ni para recuperar la supervivencia de las células CldU⁺ ni para incrementar la proliferación y/o supervivencia de las células IdU⁺.

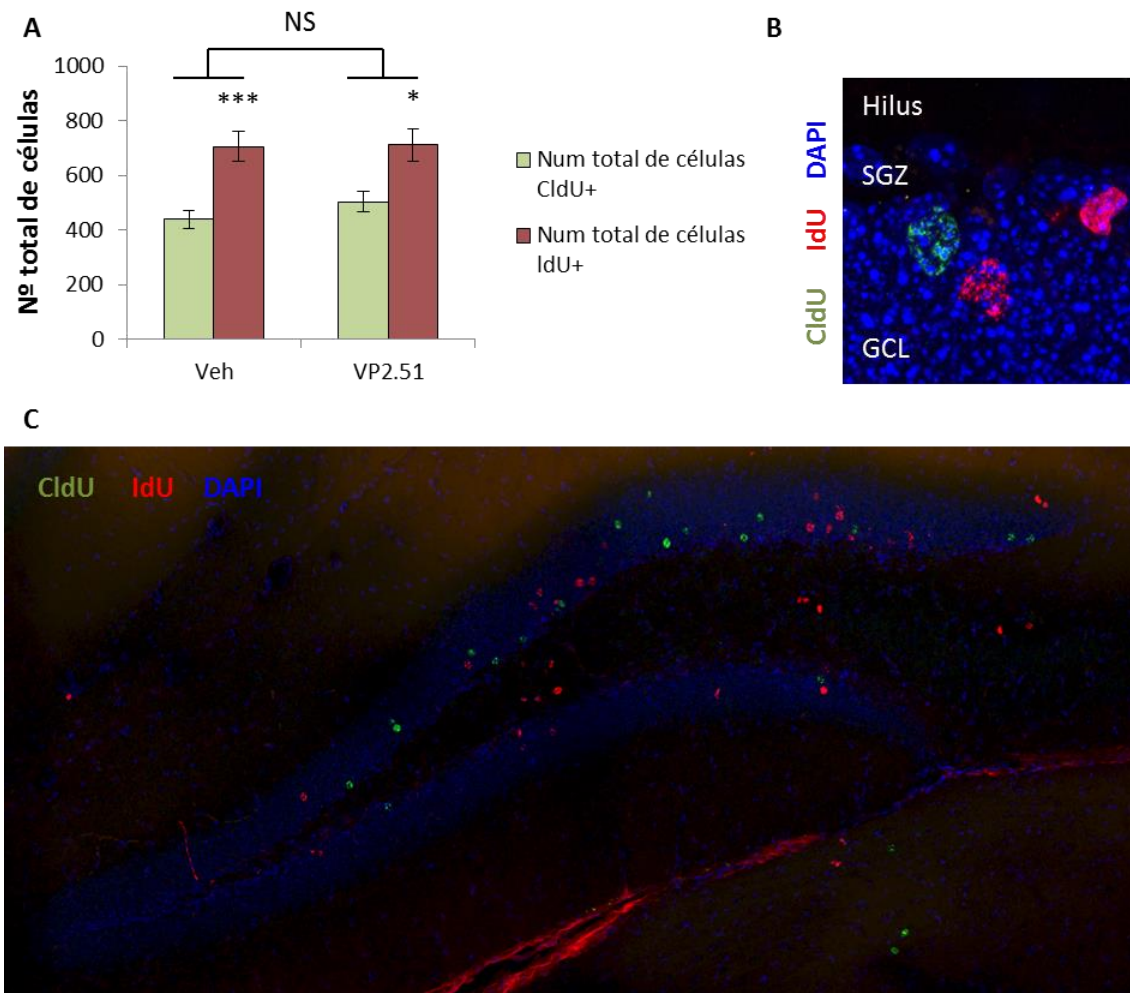


Figura 50: Efecto del FST en la proliferación y/o supervivencia de las células generadas 24h antes y 48h después del FST. (A) Número total de células generadas 24h antes (CldU, en verde) y número total de células generadas 48h después (IdU, rojo) de FST en animales tratados con vehículo y VP2.51. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. *p<0,05, ***p<0,001 y NS no significativo (t de Student). **(B)** Imagen de microscopía confocal representativa de dos células IdU⁺, en rojo, y una célula CldU⁺, en verde. En azul se muestra el DAPI. SGZ zona subgranular y GCL capa celular granular. **(C)** Imagen de microscopía confocal de un giro dentado completo. Células CldU en verde, IdU en rojo y el DAPI en azul. Obsérvese la mayor cantidad de células IdU positivas.

A continuación, nos propusimos estudiar si el fármaco tenía efectos específicos en la subregión ventral. Como se observa en la figura 51, no hay diferencias significativas entre el número total de células, tanto dorsales **(A)** como ventrales **(B)**, nacidas 24h antes (CldU) y 48h después (IdU) del FST.

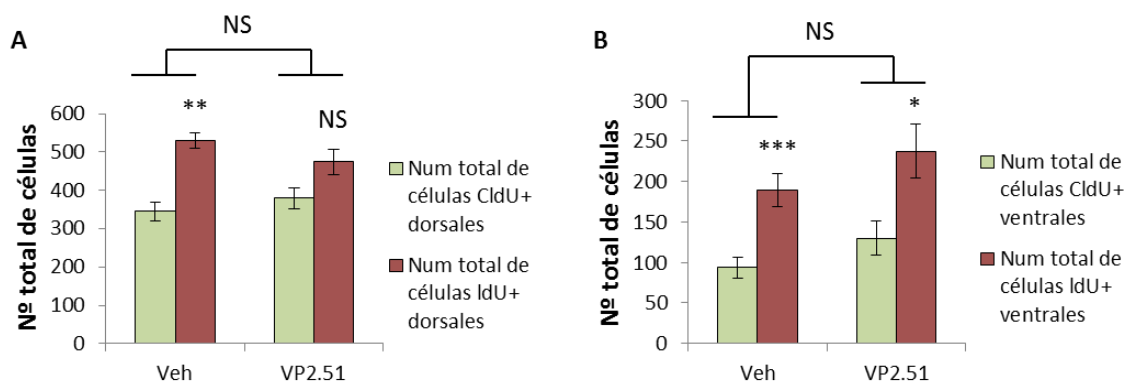


Figura 51: Efecto del FST en la proliferación y/o supervivencia de las células generadas, en la sub-región dorsal y ventral, 24h antes y 48h después del FST. (A) Número total de células generadas 24h antes (CldU, en verde) y número total de células generadas 48h después (IdU, rojo) del FST, en la sub-región dorsal, en animales tratados con vehículo y VP2.51. **(B)** Número total de células generadas 24h antes (CldU, en verde) y número total de células generadas 48h después (IdU, rojo) del FST, en la sub-región ventral, en animales tratados con vehículo y VP2.51. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y NS no significativo (t de Student).

Conclusiones: El FST genera una disminución de la supervivencia de las células nacidas 24h antes del FST respecto a las nacidas 48h después. El VP2.51 no es capaz de aumentar la proliferación y/o supervivencia de las subpoblaciones de células nacidas 24h antes y 48h después del FST. Además en el estudio de las sub-regiones no se observan cambios por el tratamiento farmacológico.

3.3 Efecto del VP2.51 en las subpoblaciones neurogénicas inmaduras.

Hipotetizamos que el efecto del FST en la supervivencia y/o proliferación de las células generadas 24h antes y 48h después del FST podía generar un desequilibrio en la tasa neurogénica basal del sistema. Por esta razón analizamos, en este modelo experimental, si el fármaco tiene efectos específicos en subpoblaciones neurogénicas de distinta edad y estado de maduración. Nos interesó medir el efecto del fármaco en las poblaciones inmaduras DCX^+ y $Calret^+$, así como en las subpoblaciones $DCX^+/Calret^-$, $DCX^+/Calret^+$ y $DCX^-/Calret^+$, después de una disminución de la supervivencia y/o proliferación celular.

En la figura 52 se puede observar un efecto diferencial en las diferentes poblaciones y subpoblaciones. El fármaco actuó selectivamente aumentando la supervivencia de la población $Calret^+$ ($p=0,046$) y la subpoblación $DCX^+/Calret^+$ ($p=0,043$) un 20%. La población DCX^+ y las subpoblaciones $DCX^+/Calret^-$ y $DCX^-/Calret^+$ resultaron no significativas.

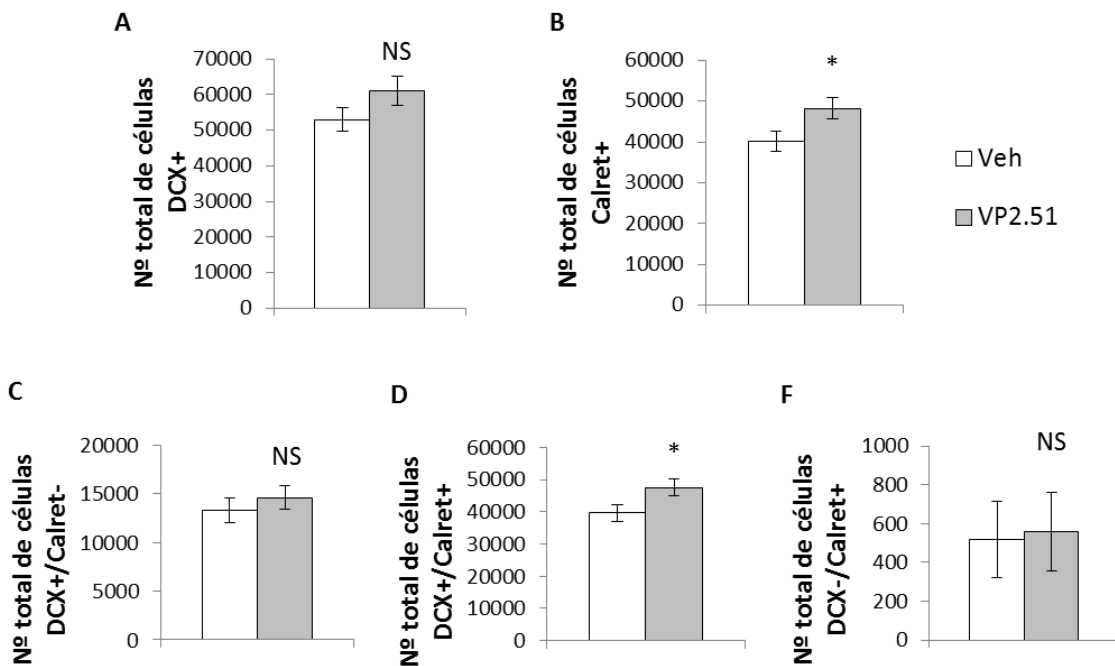


Figura 52: Efecto del VP2.51 en las poblaciones inmaduras. (A) Número total de células de la población DCX^+ . (B) Número total de células de la población $Calret^+$, (C) Número total de células de la subpoblación $DCX^+/Calret^-$. (D) Número total de células de la subpoblación $DCX^+/Calret^+$. (E) Número total de células de la subpoblación $DCX^-/Calret^+$. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ y NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El VP2.51, actuó de forma específica incrementando la supervivencia de la población Calret⁺ y la subpoblación DCX⁺/Calret⁺, ambas postmitóticas.

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 4:

Efecto del VP2.51 en un modelo de depresión mayor. Comparativa con la fluoxetina.

Se ha mostrado que el VP2.51 es un antidepresivo potencial en la prueba del FST, además ha demostrado tener la capacidad de recuperar animales estresados y/o depresivos con un FST modificado. Los resultados hasta ahora expuestos parecen indicar una vía de actuación neurogénico-dependiente. En este capítulo evaluaremos el efecto del fármaco en un modelo de depresión mayor (MDD, del inglés Major Depressive Disorder).

La exposición a un ambiente estresante es el principal factor de riesgo ambiental relacionado con la aparición de la depresión (Kessler 1997, Kendler, Karkowski et al. 1999, Keller, Neale et al. 2007). Por esta razón muchos modelos animales han tratado de reproducir los síntomas de la depresión mediante la exposición a estrés. El modelo del estrés crónico impredecible suave (UCMS, del inglés unpredictable chronic mild stress), ha sido ampliamente usado como modelo murino de MDD.

Varios estudios asocian la actividad de la GSK-3 con la depresión. En seres humanos se ha observado un aumento de la expresión de la GSK3- β en los hipocampos *post-mortem* de pacientes depresivos (Oh, Park et al. 2010). También se ha visto una disminución de la pGSK-3 β ser9 (forma inactiva) y de la β -catenina en corteza prefrontal ventral de pacientes depresivos (Karege, Perroud et al. 2007, Karege, Perroud et al. 2012). Sin embargo, otro estudio, no encontró diferencias significativas en los niveles de GSK-3 β en la misma región (Beasley, Cotter et al. 2002). Estos resultados sugieren que en la modulación de la actividad tiene un papel más relevante que la expresión de la quinasa en los pacientes con MDD.

El modelo del UCMS ha demostrado aumentar la expresión de la GSK3- β en el hipocampo (Silva, Mesquita et al. 2008). Otro trabajo ha probado que la sobre-expresión de la GSK-3 β en el hipocampo murino genera un aumento de la sensibilidad y susceptibilidad al UCMS (Zhang, Song et al. 2013). En concordancia con este artículo, se ha visto que el silenciamiento de la GSK-3 β en el hipocampo murino induce efecto antidepresivo en animales estresados crónicamente (Omata, Chiu et al. 2011).

Actualmente sólo dos trabajos han estudiado el efecto de la inhibición de la GSK-3 β en un modelo de UCMS (Silva, Mesquita et al. 2008, Ma, Dang et al. 2013). Mientras Ma *et al* no ven un efecto antidepresivo del inhibidor SB216723, Silva *et al* sí describe

un efecto antidepresivo con el inhibidor AR-A014418. Estas discrepancias en los resultados pueden deberse al tipo de inhibidor, pero más probablemente se deban a la diferente pauta temporal, mientras Ma *et al* realizó una única administración, Silva *et al* administró diariamente durante 14 días.

Por todas estas razones consideramos que es necesario un estudio más profundo, que evalúe no solo el efecto antidepresivo del inhibidor en un modelo de MDD, sino que además compare su eficiencia con un antidepresivo comercial, como es la fluoxetina, y se describan por primera vez los cambios histológicos que induce el tratamiento.

Para lograr este objetivo dispusimos de 40 ratones C57/BL6J machos de 6-7 semanas de edad (figura 53). Al comienzo del experimento los dividimos en 2 grupos experimentales: el grupo experimental CTR (N=10) y el grupo experimental UCMS (N=30). Tras 4 semanas de UCMS (grupo UCMS) se realizó un EPM para evaluar el estado de ansiedad de los animales UCMS en comparación con los animales CTR. El grupo experimental UCMS se dividió en 3 grupos experimentales (Veh, VP2.51 y Fluox. Cada grupo N=10), la división se hizo teniendo en cuenta los datos del EPM y los pesos (que se midieron semanalmente) para tratar de hacer los grupos los más homogéneos posibles (véase discusión al respecto en la sección de discusión). 24h después del EPM se comenzaron a tratar los animales, CTR y Veh con el vehículo, VP2.51 con una dosis de 2,5 mg/kg de VP2.51 y Fluox con una dosis de 10 mg/kg de fluoxetina, de lunes a viernes durante 2 semanas. 72h antes del sacrificio se evaluó la anidación a las 5 y 24h. 24h antes del sacrificio se evaluó el efecto antidepresivo del VP2.51 y fluoxetina con una única sesión de FST.

Nuestras hipótesis experimentales fueron:

1. Efecto del protocolo UCMS y del tratamiento ¿Induce cambios respecto a un animal CTR?
2. ¿Los tratamiento farmacológicos inducen cambios respecto a los animales vehículo-UCMS?
3. ¿Hay diferencias entre la fluoxetina y el VP2.51?

Las hipótesis 1 y 2 se analizaron estadísticamente con un ANOVA de una vía. Las diferencias entre grupos se realizaron con un *post-hoc* de Dunnet. La hipótesis 3 se analizó mediante una t-Student que comparó el grupo VP2.51 y el fluox. Por ortodoxia científica también se realizó el *post-hoc* de Bonferroni. En el texto se detallarán los p-valores del *post-hoc* de Bonferroni, aunque en las gráficas se representaran los resultados obtenidos con el *post-hoc* de Dunnet y la t-Student.

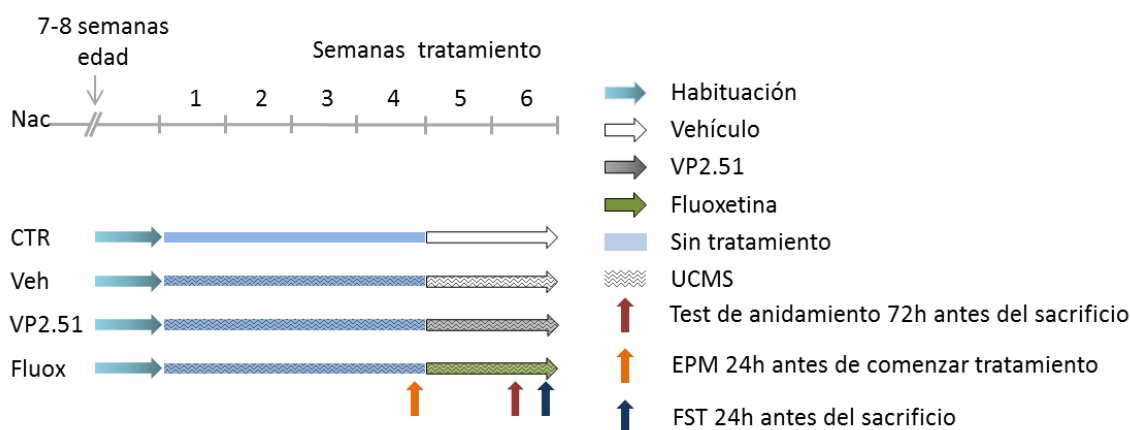


Figura 53: Diseño experimental.

1. Parámetros críticos para evaluar la eficiencia del protocolo UCMS y del tratamiento farmacológico.

El UCMS es un modelo de depresión que se propuso por primera vez por Katz en 1982 (Katz 1982) y después se desarrolló por Papp y Willner (Papp, Willner et al. 1991, Willner, Muscat et al. 1992). El modelo implica exponer al animal a estreses suaves, de forma impredecible y durante varias semanas (Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Existen algunos parámetros biológicos y comportamentales que ayudarán a monitorizar la eficiencia del paradigma experimental del UCMS y del tratamiento farmacológico.

1.1 Peso corporal y ganancia de peso.

Una forma de medir el efecto del UCMS en los animales es mediante el seguimiento de la ganancia en peso. Se ha descrito una disminución de la ganancia de peso durante el protocolo del UCMS (Bielajew, Konkle et al. 2002, Silva, Mesquita et al. 2008, Schweizer, Henniger et al. 2009, Surget, Wang et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2011, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013, Nollet, Le Guisquet et al. 2013). También algunos autores han observado una recuperación del peso perdido hasta valores normales con un tratamiento crónico con antidepresivos (Surget, Wang et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2011, Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Sin embargo otros autores no han observado que el fármaco antidepresivo haya sido capaz de revertir esa pérdida de peso (Silva, Mesquita et al. 2008).

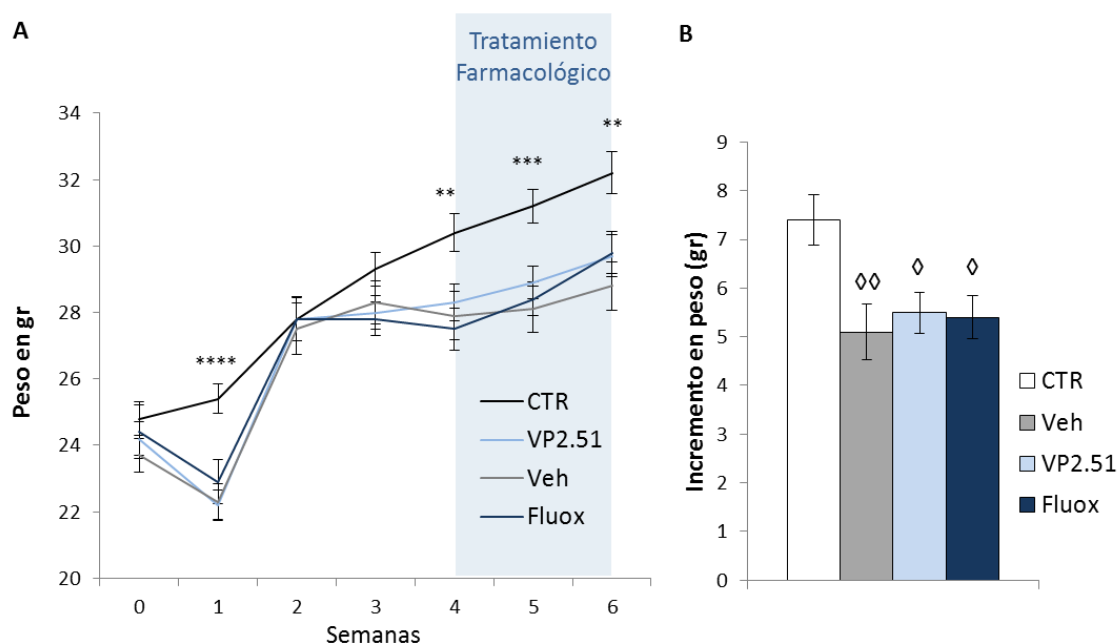


Figura 54: Peso corporal y ganancia en peso. (A) Gráfica que representa el peso corporal en gramos a lo largo del experimento. Los animales se pesaron antes de comenzar el tratamiento (semana 0) y a continuación comenzó el protocolo UCMS en los grupos experimentales Veh, VP2.51 y Fluox. En la semana 4 se comenzó el tratamiento farmacológico. **(B)** Incremento del peso en gramos. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,000$.

Como se observa en la figura 54, el comienzo del protocolo de UCMS indujo una pérdida de peso significativa ($p < 0,001$), lo que nos señaló la eficacia del protocolo. Sin embargo en la segunda semana recuperaron el peso perdido hasta valores normales de los CTR. En este punto se intensificó la frecuencia de los estreses y la semana siguiente observamos una caída del peso, sin ser significativamente diferente a los CTR ($p = 0,199$). A la semana 4 ya obtuvimos pesos significativamente diferentes a los CTR ($p = 0,009$). En la semana 4 comenzó el tratamiento con los fármacos antidepresivos VP2.51 y fluoxetina. Como se observa en la gráfica de la figura, ninguno de los tratamientos fue capaz de revertir los pesos a valores de los animales CTR ($p = 0,001$ y $P = 0,003$). También estudiamos el incremento en peso total. Como se observa en la figura B, los animales sometidos al protocolo de UCMS tienen un incremento menor que los animales CTR ($p = 0,009$). De nuevo se observa que los fármacos no fueron capaces de recuperar el incremento del peso a valores normales.

Conclusiones: El UCMS disminuyó inicialmente de manera significativa el peso corporal en comparación con los animales CTR. Posteriormente hubo una recuperación del peso, que volvió a ser significativo tras un aumento de la frecuencia de los estresores. El tratamiento farmacológico no fue capaz de recuperar en ninguno de los casos, el peso a valores normales.

1.2 Estado del pelaje y de la anidación.

Cómo parámetros críticos para evaluar el efecto del protocolo del UCMS en nuestros animales se utilizaron el estado del pelaje y de la anidación (Nollet, Le Guisquet et al. 2013) (Current Protocols in Pharmacology).

En roedores, el estado del pelaje es muy sensible al estrés (Kalueff and Tuohimaa 2005, Kalueff and Tuohimaa 2005). Durante el protocolo de UCMS, el deterioro del estado del pelaje puede deberse a una disminución del acicalamiento por una

alteración de su conducta normal. El correlato con el ser humano sería la baja higiene personal, que se observa en pacientes depresivos. Según los parámetros descritos y como muestra la figura 55, no observamos alteraciones en el pelaje a lo largo del protocolo de UCMS.



Figura 55: Estado del pelaje a lo largo del protocolo de UCMS. Como se observa en la figura, no se detectaron cambios en el pelaje de los animales.

Para los roedores, el anidamiento es importante para la conservación de la temperatura corporal. El anidamiento es fácilmente medible con cuadrados de algodón altamente empaquetados. Los roedores, inicialmente lo desmenuzan, y posteriormente hacen su nido. De acuerdo con Nollet *et al* (Nollet, Le Guisquet et al. 2013), el UCMS debería disminuir significativamente su capacidad de anidamiento. Nosotros no observamos que el protocolo alterase el anidamiento en ninguna de las condiciones experimentales. Todos los animales obtuvieron la máxima puntuación a las 24h de añadir los cuadrados de algodón empaquetados, con un nido con paredes y una entrada pequeña (figura 56).

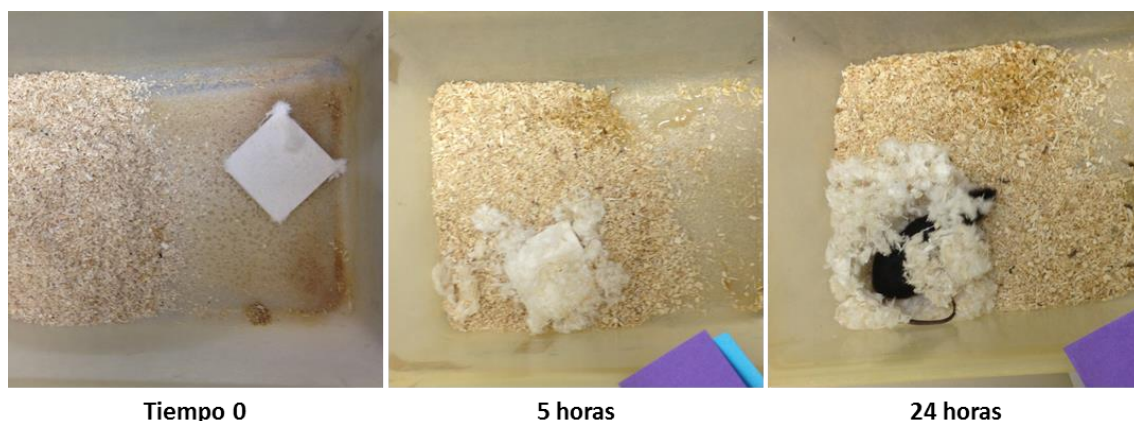


Figura 56: Fotografías representativas de la elaboración del nido. Todos los animales desmenuzaron el algodón y a las 24h tenía creado su nido.

Conclusiones: El UCMS no alteró ni el pelaje ni la capacidad de anidamiento durante el protocolo de UCMS.

1.3 Estudio de la conducta relacionada con la ansiedad antes y después del tratamiento.

Una premisa importante antes de comenzar el tratamiento farmacológico era cerciorarnos que nuestros animales estaban depresivos. Como las pruebas que evalúan el estado depresivo son muy agresivas, llegando a inducir un comportamiento de tipo ansioso y/o depresivo (ver discusión, consideraciones técnicas) y dado que queríamos comparar el estado depresivo con los animales CTR, estos también debían someterse a la prueba. Para evitar inducir un comportamiento de tipo ansioso y/o depresivo en los animales CTR, decidimos evaluar el estado de ansiedad, con un EPM, que no induce ningún efecto comportamental en los animales testados y nos proporciona una indicación razonable de que el UCMS estaba teniendo un efecto además de la indicación del peso corporal.

Cómo se observa en la gráfica 57, el UCMS indujo un aumento significativo en el tiempo en los brazos abiertos ($p=0,014$), una disminución del tiempo en los brazos

cerrados ($p=0,011$) y un incremento en el número de entradas en los brazos abiertos ($p=0,039$).

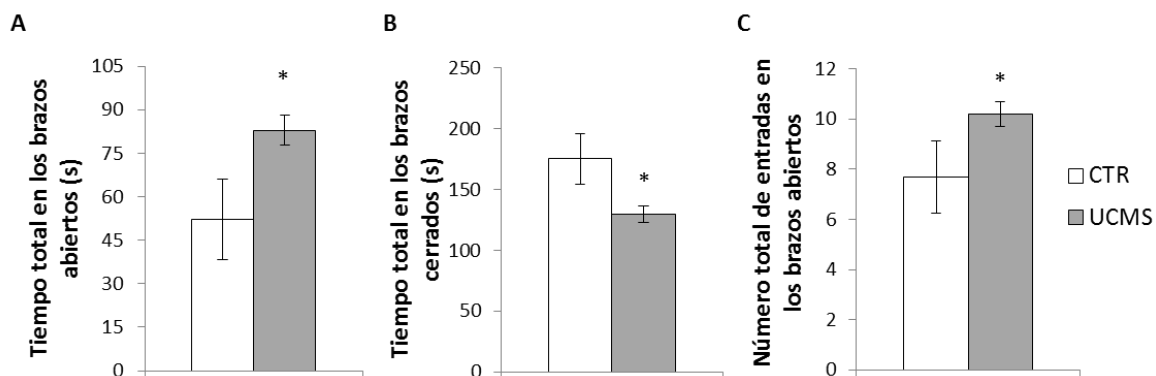


Figura 57: Efecto del UCMS en la conducta de tipo ansiosa. (A) Tiempo total en los brazos abiertos. **(B)** Tiempo total en los brazos cerrados. **(C)** Número total de entradas en los brazos abiertos. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. * $p<0,05$ (t de Student).

2. Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y la fluoxetina en un modelo de MDD.

Se realizó un FST a todos los grupos experimentales, controles, vehículos, VP2.51 y fluoxetina. Como hemos comentado previamente, el FST está indicado para evaluar la eficiencia antidepresiva de un fármaco. La medida de eficacia la determina el tiempo de inmovilidad. Cuanto menor sea el tiempo de inmovilidad, mayor es la eficacia antidepresiva.

Los resultados de esta prueba indicaron que el protocolo de UCMS generó una conducta de tipo depresivo (figura 58), aumentando significativamente el tiempo de inmovilidad de los animales vehículo (ANOVA $p=0,002$ *post-hoc* $p=0,013$). La fluoxetina ejerció su efecto antidepresivo y disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad respecto al grupo vehículo (ANOVA $p<0,001$ *Post-hoc* $p<0,001$). El VP2.51

sin embargo no mostró diferencias significativas ni con el grupo control ni con el grupo vehículo. La comparativa entre el VP2.51 y la fluoxetina demostró que en esta prueba la fluoxetina es significativamente mejor ($p=0,019$).

El análisis *post-hoc* de Bonferroni mostró que el grupo vehículo tenía diferencias significativas con el grupo control ($p=0,028$) y con el grupo fluoxetina ($p=0,002$).

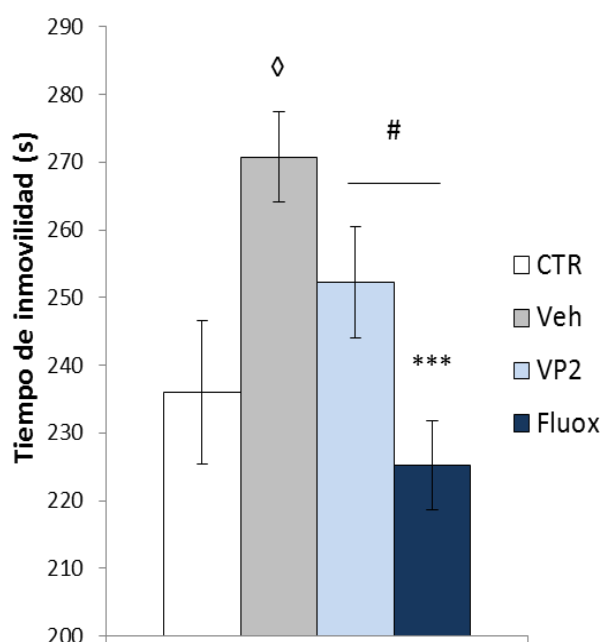


Figura 58: Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y de la fluoxetina en un modelo de MDD. Se muestra la inmovilidad de un FST. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. \diamond Indica el efecto del UCMS, * indica el efecto del tratamiento antidepresivo y # indica el efecto del VP2.51 en comparación con la fluoxetina, $\diamond, \# p<0,05$ y $***p<0,001$.

Conclusiones: El UCMS indujo un estado depresivo en los ratones sometidos al UCMS. El VP2.51 tuvo un efecto antidepresivo parcial. No mostró diferencias ni con el grupo vehículo, ni con el grupo control. La fluoxetina resultó más efectiva que el VP2.51 y ejerció un efecto antidepresivo, obteniendo valores de comportamiento depresivo similares a los animales controles.

3. Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocampal, en la capa granular del giro dentado y el área de la SGZ.

Como se explicó en la introducción, varios autores han detectado cambios en el volumen del hipocampo de pacientes depresivos (Lupien, Evans et al. 2007, Pruessner, Dedovic et al. 2010, Ahdidan, Hviid et al. 2011, Kempton, Salvador et al. 2011, Lucassen, Pruessner et al. 2014), sin embargo se desconoce si es causa o efecto de la patología.

Aunque los estudios de resonancia magnética han demostrado una disminución en el volumen hipocampal en pacientes con MDD, han sido necesarios mejoras en la resolución espacial para detectar cambios en las diferentes subregiones hipocampales. En el eje longitudinal se han detectado cambios volumétricos del hipocampo medial y caudal (Huang, Coupland et al. 2013). También se ha descrito una disminución del volumen del GD en pacientes no tratados con antidepresivos, o que recientemente han empezado el tratamiento (Huang, Coupland et al. 2013). Resulta especialmente interesante que ambas alteraciones volumétricas han sido revertidas por el uso de antidepresivos (Schermuly, Wolf et al. 2011, Lucassen, Pruessner et al. 2014).

La AHN ha sido recientemente implicada en los cambios volumétricos hipocampales. La hipótesis neurogénica de la depresión propone que la reducción de la AHN, puede afectar a la estructura hipocampal.

Por estas razones, nos planteamos estudiar si el volumen de la formación hipocampal, el giro dentado y el área de la SGZ estaban alterados en nuestros grupos experimentales sometidos al UCMS, y si los tratamientos farmacológicos revertían estas alteraciones.

Como se observa en los histograma (B) de la figura 59, el protocolo de UCMS indujo una reducción del volumen hipocampal en los grupos vehículo y VP2.51 (Anova $p=0,02$, *post-hoc* $p=0,05$ y $0,009$ respectivamente). El tratamiento con fluoxetina mostró no tener diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales. El volumen de la capa granular del giro dentado no mostró alteraciones ni por el protocolo del UCMS, ni por los tratamientos farmacológicos (figura 59 histograma C). Finalmente, se observó una reducción significativa en el área de la SGZ en el grupo VP2.51 inducida

por el protocolo de UCMS (ANOVA $p=0,045$, *post-hoc* $p=0,018$), sin embargo esta reducción no fue estadísticamente significativa ni con el grupo vehículo ni con el grupo tratado con fluoxetina (figura 59, histograma D).

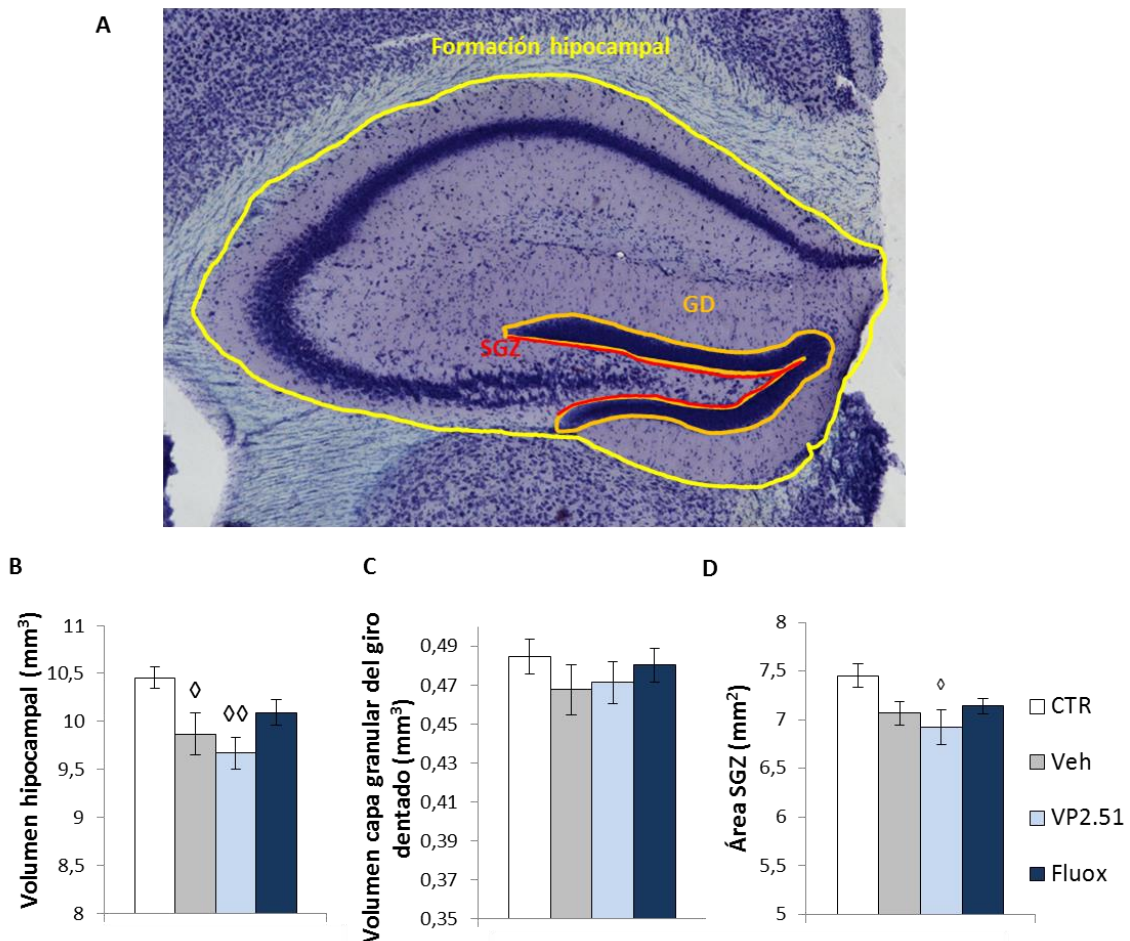


Figura 59: Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y de la fluoxetina en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocámpal, en la capa granular del giro dentado y el área de la SGZ. (A) Fotografía representativa de una sección tras la tinción de Nissl. Sobre ella se han delineado la formación hipocámpal, la capa granular del GD y la SGZ. **(B-D)** Histogramas con el volumen hipocámpal, volumen de la capa granular del GD y el área de la SGZ respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. \diamond Indica el efecto del UCMS. \diamond $p<0,05$ y $\diamond\diamond$ $p<0,01$. GD giro dentado y GGZ zona subgranular.

El análisis *post-hoc* de Bonferroni indicó que existían diferencias significativas en el volumen hipocampal y en el área de la SGZ entre el grupo control y el VP2.51 ($p=0,02$ y $p=0,039$ respectivamente).

Conclusiones: El UCMS indujo una disminución del volumen hipocampal en los animales vehículo y VP2.51. La fluoxetina no mostró diferencias con ninguno de los grupos experimentales. El volumen de la capa granular del GD no se vió alterado ni por el UCMS ni por los tratamientos farmacológicos. Finalmente, el área de la SGZ, sólo se vio alterada en el grupo VP2.51 respecto a los animales controles. Sin embargo ésta no mostró diferencias entre el grupo vehículo o fluoxetina.

4. Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la neurogénesis hipocampal adulta.

La hipótesis neurogénica de la depresión propone que una reducción prolongada de la neurogénesis, producida por el estrés, puede afectar a la estructura y volumen hipocampal en la MDD. Además un tratamiento antidepresivo efectivo requiere aumentar la tasa neurogénica.

Quisimos evaluar no sólo los cambios histológicos que inducen los tratamientos antidepresivos, si no estudiar el efecto del protocolo en los animales vehículo.

4.1 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la proliferación.

En tejido *post-mortem* humano no se han visto diferencias significativas en la proliferación hipocampal de pacientes depresivos, sin embargo se ha descrito un

aumento de las células en ciclo (Ki67⁺) en pacientes tratados con antidepresivos (Boldrini, Underwood et al. 2009, Lucassen, Stumpel et al. 2010).

Sin embargo, en roedores la mayoría de los artículos describen una disminución de la proliferación en los animales sometidos a un UCMS (Heine, Maslam et al. 2004, Goshen, Kreisel et al. 2008, Surget, Saxe et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Hanson, Owens et al. 2011, Tanti, Westphal et al. 2013). Aunque existe cierta controversia, un gran número de trabajos con animales no estresados han demostrado que el tratamiento con fármacos antidepresivos, como la fluoxetina, incrementan la proliferación (Malberg, Eisch et al. 2000, Santarelli, Saxe et al. 2003, Castro, Varea et al. 2010). Este efecto pro-neurogénico de la fluoxetina también se ha descrito en animales sometidos a un UCMS (Santarelli, Saxe et al. 2003, Surget, Saxe et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Tanti, Westphal et al. 2013).

Por estas razones quisimos, no solo estudiar el efecto del UCMS en los animales vehículos, si no si el tratamiento farmacológico era capaz de revertir dichas alteraciones. Utilizamos el marcador pH3 para ver las células en mitosis y el marcador Ki67 para estudiar el número de células en ciclo. También se analizó el ratio entre las células en ciclo y las células en mitosis. Cuanto mayor fue el ratio, menor número de células que estando en ciclo, entraron en mitosis.

Como se observa en la figura 60 (C), el protocolo del UCMS disminuyó significativamente las células en mitosis (pH3⁺) del grupo VP2.51 (ANOVA $p=0,033$, *post-hoc* $p=0,033$). Curiosamente esta disminución no se observó en el grupo vehículo. El tratamiento farmacológico con fluoxetina y VP2.51 no alteró significativamente el número de células en mitosis respecto al grupo vehículo. El tratamiento con fluoxetina incrementó significativamente el número de células pH3⁺ respecto al grupo VP2.51 ($p=0,034$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni determinó que no existían diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales.

El número de células en ciclo (Ki67⁺) no se vio alterado ni por el UCMS, ni por los tratamientos farmacológicos (figura 60 D).

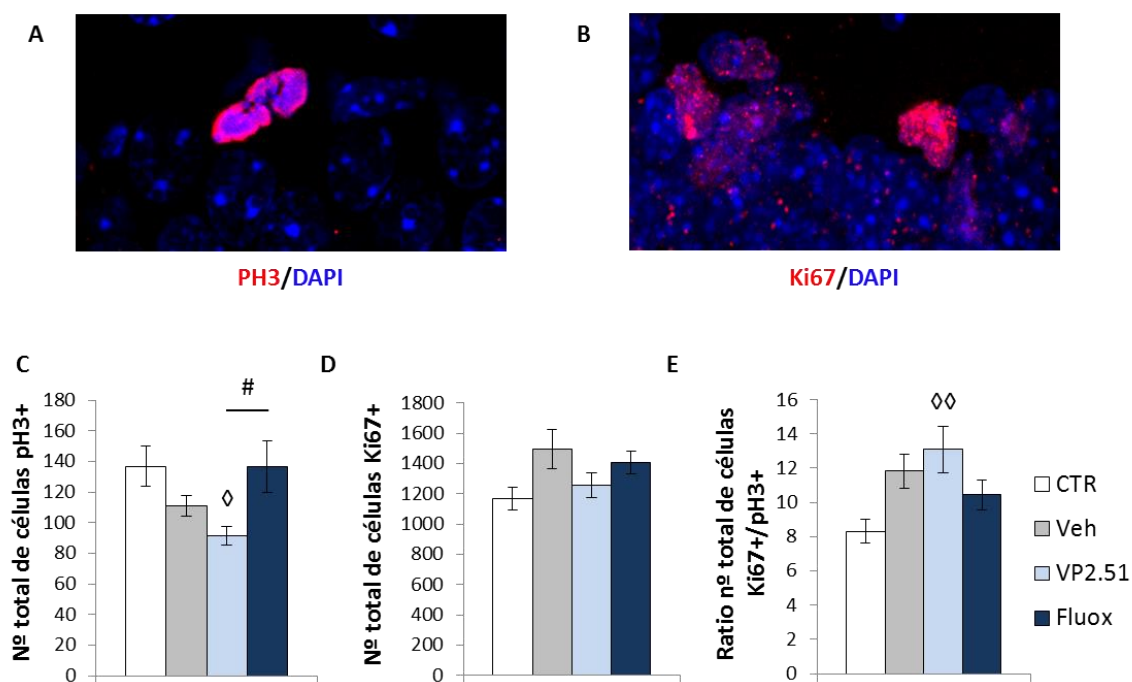


Figura 60: Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y de la fluoxetina en un modelo de MDD, en la proliferación. (A-B) Imágenes de microscopía confocal de unas secciones inmunoteñidas con pH3 y Ki67 respectivamente. **(C-D)** Histogramas con el número total de células en mitosis (pH3⁺), células en ciclo (Ki67⁺) y el ratio entre el número de células en ciclo y el número de células en mitosis (Ki67⁺/pH3⁺) respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. \diamond Indica el efecto del UCMS. # indica el efecto del VP2.51 en comparación con la fluoxetina, $\diamond, \#$ $p < 0,05$ y $\diamond\diamond$ $p < 0,01$.

Curiosamente, cuando se estudió el ratio entre el número de células en ciclo y el número de células en mitosis, sólo se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con VP2.51 (ANOVA $p = 0,017$, *post-hoc* $p = 0,007$), aunque cabe remarcar una tendencia entre el grupo control y el vehículo (*post-hoc* $p = 0,062$) (figura 60 E). El análisis *post-hoc* de Bonferroni determinó lo mismo, sólo hay diferencias significativas entre el grupo control y el VP2.51 ($p = 0,014$).

Conclusiones: El UCMS indujo una disminución del número de células en mitosis del grupo VP2.51. La fluoxetina incrementó significativamente el número de células en mitosis respecto al grupo VP2.51, sin embargo no mostró diferencias significativas con el grupo vehículo. El número de células en ciclo no se vio alterado en ninguno de los grupos experimentales. Y el ratio entre el número de células en ciclo y el número de células en mitosis sólo se vio alterado significativamente en el grupo VP2.51.

4.2 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en las sub-poblaciones inmaduras de la SGZ.

Mientras existen ciertos trabajos que reportan el efecto del UCMS y de los tratamientos antidepresivos en la proliferación de la SGZ, pocos estudios han evaluado el efecto en la supervivencia. Se ha reportado una disminución de la supervivencia de células de en torno a 3 semanas de edad (Lee, Kim et al. 2006) y de células de 4 semanas de edad (Nollet, Gaillard et al. 2012). También se ha reportado una disminución de las células DCX⁺ (Lee, Kim et al. 2006, Goshen, Kreisel et al. 2008, Dagyte, Crescente et al. 2011, de Andrade, Cespedes et al. 2013, Tanti, Westphal et al. 2013), así como una recuperación hasta valores controles con el tratamiento antidepresivo (Nollet, Gaillard et al. 2012, Tanti, Westphal et al. 2013). Sin embargo poca atención se ha dado a las diferentes sub-poblaciones.

Por estas razones consideramos importante, no solo estudiar el efecto de nuestro fármaco experimental, sino estudiar cómo estas sub-poblaciones inmaduras responden a un protocolo de UCMS y el efecto de la fluoxetina en estas sub-poblaciones inmaduras de la SGZ. Se analizaron las poblaciones DCX⁺ y Calret⁺, así como las sub-poblaciones DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺, estando ordenadas de menor a mayor edad.

Como se observa en la figura 61 (A), y de acuerdo a la literatura, se observó que el protocolo de UCMS indujo una disminución significativa de las células DCX⁺ del grupo vehículo (ANOVA $p=0,001$, *post-hoc* $p=0,03$). Sin embargo, en contra de lo esperado, los tratamientos farmacológicos con el VP2.51 y la fluoxetina, no solo no mostraron diferencias significativas respecto al grupo vehículo, sino que además resultaron tener diferencias significativas con el grupo control (*post-hoc* $p=0,005$ y $p=0,008$ respectivamente). No se observaron diferencias en la supervivencia de las DCX⁺ en función del tratamiento administrado. El *post-hoc* de Bonferroni determinó que había diferencias entre el grupo control y los grupos VP2.51 y fluoxetina ($p=0,011$ y $0,018$ respectivamente). Con el grupo vehículo se observó una tendencia ($p=0,067$).

La población Calret⁺, no sólo no se vio afectada por los tratamientos farmacológicos, si no tampoco por el protocolo del UCMS (figura 61 B).

En el estudio de la sub-población DCX⁺/Calret⁻ (figura 61 C), se reportó un efecto similar al visto en la población DCX⁺. El tratamiento del UCMS, disminuyó significativamente el número de células DCX⁺/Calret⁻ del grupo vehículo (ANOVA $p=0,001$, *post-hoc* $0,004$). Los tratamientos farmacológicos con el VP2.51 y la fluoxetina no promovieron una restitución en la supervivencia de esta sub-población, sino que además resultaron ser estadísticamente significativos con los animales controles ($p<0,001$ y $p=0,008$ respectivamente). No se observaron diferencias en la supervivencia de las DCX⁺/Calret⁻ en función del tratamiento administrado. El *post-hoc* de Bonferroni determinó que había diferencias entre el grupo control y los grupos vehículo, VP2.51 y fluoxetina ($p=0,008$, $p=0,001$ y $p=0,017$ respectivamente).

Las sub-poblaciones DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺ no sólo no se vieron afectadas por los tratamientos farmacológicos, sino que tampoco por el protocolo del UCMS (figura 61 D y E).

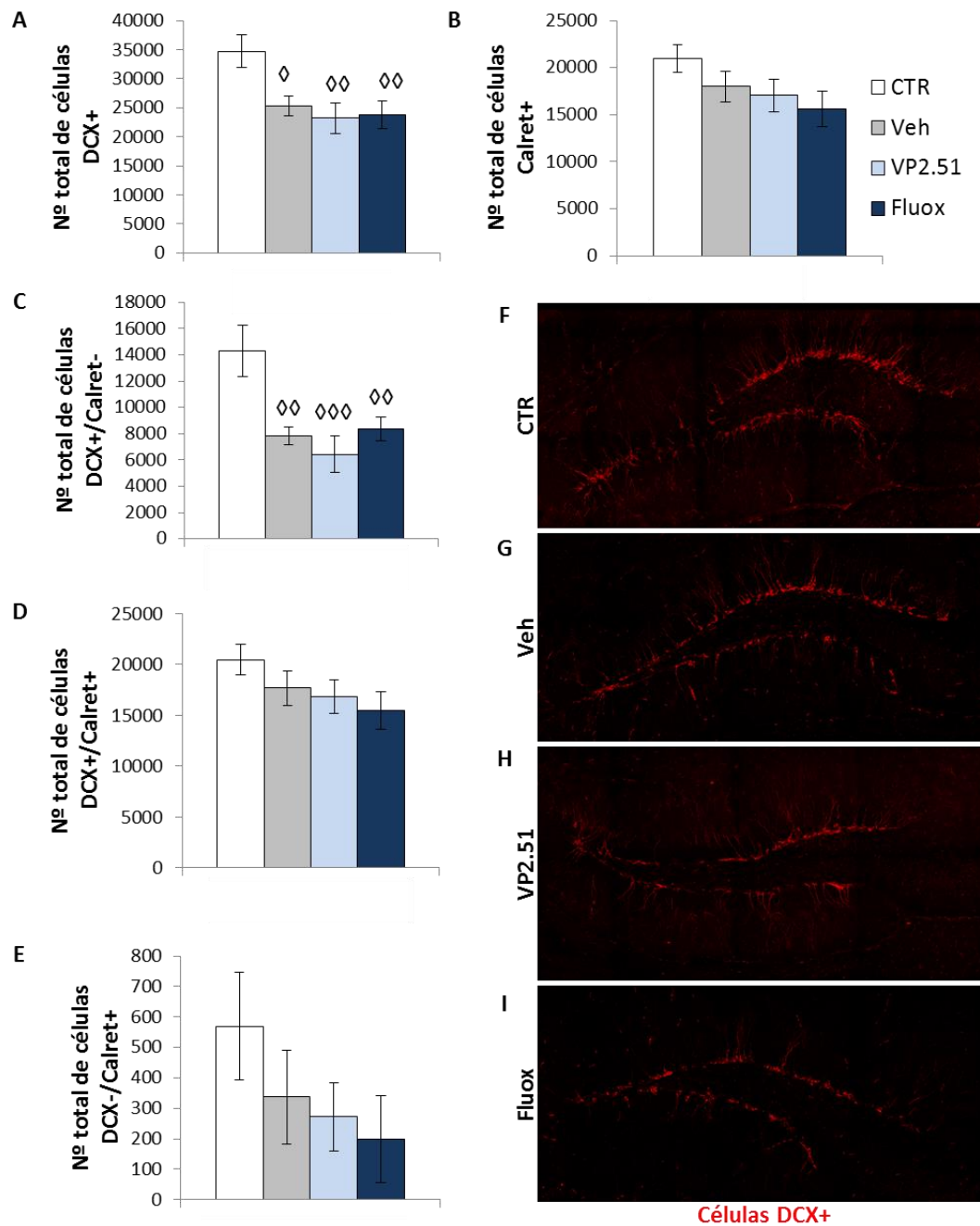


Figura 61: Estudio del efecto antidepressivo del VP2.51 y de la fluoxetina en un modelo de MDD, en las sub-poblaciones inmaduras. (A-E) Histogramas con el número total de células DCX⁺, Calret⁺, DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺ respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. **(F-I)** Imágenes representativas de microscopia confocal de unas secciones inmunoteñidas con DCX de los grupos experimentales control, vehículo, VP2.51 y fluoxetina respectivamente. [◇] Indica el efecto del UCMS. [◇] p<0,05, ^{◇◇} p<0,01 y ^{◇◇◇} p<0,001.

El número total de las poblaciones DCX⁺, Calret⁺ y sus respectivas subpoblaciones, se determinó estereológicamente con un disector físico en U (véase material y métodos: 8.1 Método del Disector físico en U). Para obtener el número total de células positivas para el marcador de interés, es necesario multiplicar las densidades medias de los stacks por el área total de la SGZ. Como se describió en el apartado “3. Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocampal, en la capa granular del giro dentado y el área de la SGZ” el protocolo del UCMS disminuyó significativamente el área de la SGZ del grupo VP2.51 (ANOVA $p=0,045$, *post-hoc* $p=0,018$), así como el área de la SGZ de los grupos vehículo y fluoxetina, sin llegar a valores estadísticamente significativos. Por esta razón nos preguntamos cómo estaban las densidades de las diferentes poblaciones y subpoblaciones. No se observaron cambios en la interpretación de los resultados cuando se evaluaron las densidades medias.

Conclusiones: El UCMS indujo una disminución de la población DCX⁺, así como de la subpoblación DCX⁺/Calret⁺. Ninguno de los tratamientos farmacológicos fue capaz de revertir dichas alteraciones. Las población Calret⁺, así como la DCX⁺/Calret⁺ y DCX/Calret⁺ no sufrieron alteraciones ni por el protocolo UCMS, ni por el tratamiento con VP2.51 y fluoxetina.

4.3 Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en las células granulares del giro dentado.

Análisis estereológicos en tejido humano *post-mortem* han determinado que no hay diferencias significativas en el número total de células granulares del giro dentado entre los pacientes con MDD y los sujetos controles (Cobb, Simpson et al. 2013).

Sin embargo se ha descrito un correlato significativo entre el tiempo del tratamiento y la densidad granular del GD. A mayor tiempo de tratamiento, mayor densidad granular (Cobb, Simpson et al. 2013).

En modelos murinos, el UCMS no ha demostrado alterar significativamente el número de células granulares del GD.

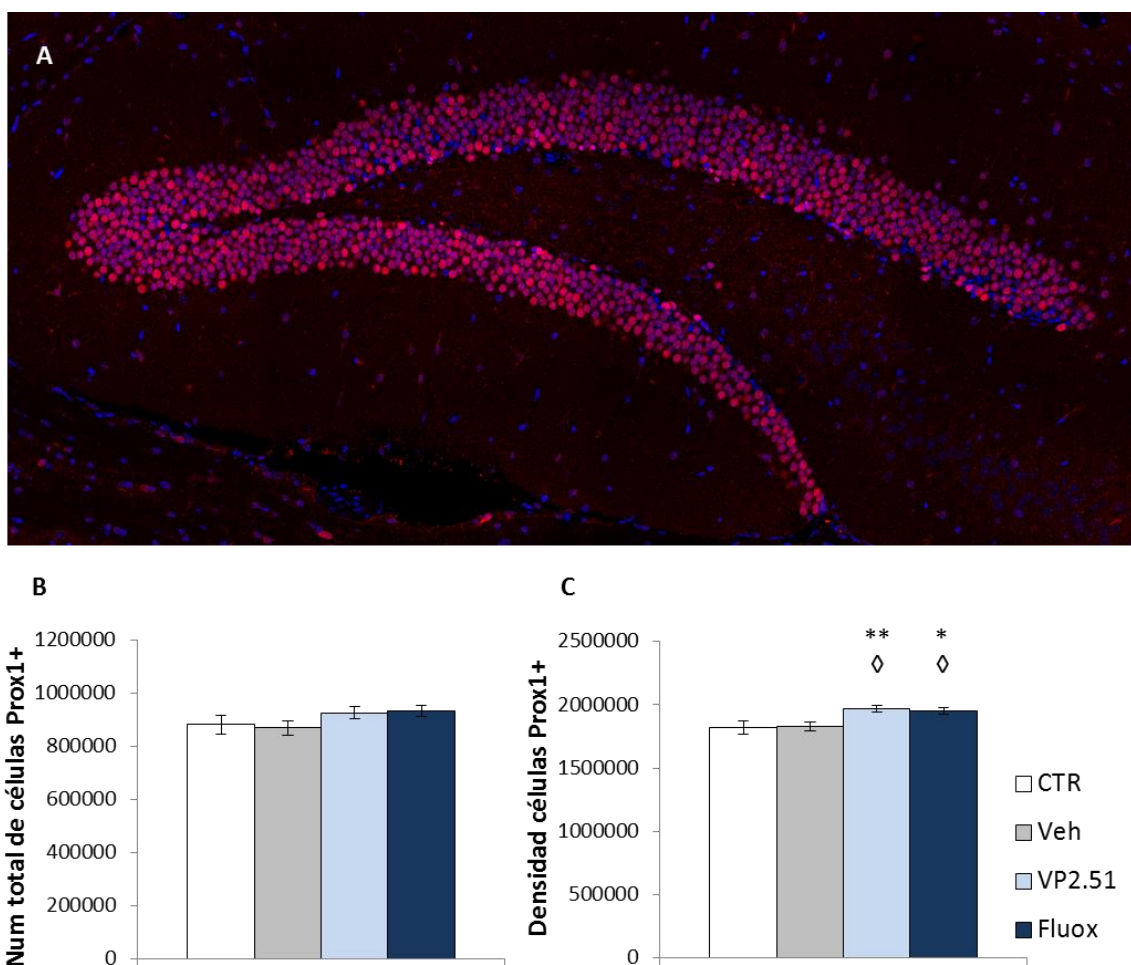


Figura 62: Efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en las células granulares del giro dentado. (A) Imagen de microscopía confocal de un corte histológico inmuneñido con Prox1, un marcador de células granulares del GD. **(B-C)** Histogramas que representan el número total y densidad de células Prox1⁺ en el GD. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. ◇ Indica el efecto del UCMS y * indica el efecto del tratamiento antidepresivo ◇,* p<0,05 y **p<0,01.

Por estas razones pensamos que sería interesante, no sólo evaluar el número total de células granulares de GD, sino testar si la densidad estaba alterada por el tratamiento farmacológico.

Se utilizó el marcador Prox1, específico de las células granulares del GD. Como se observa en la figura 62, ni el protocolo ni el tratamiento alteró en número total de células granulares (Prox1⁺).

Sin embargo, se observó una mayor densidad de células Prox1⁺ en los grupos tratados con el tratamiento farmacológico (VP2.51 y fluoxetina) respecto al grupo vehículo (ANOVA $p=0,006$, *post-hoc* $p=0,005$ y $p=0,015$ respectivamente). Estas diferencias en la densidad inducidas por el tratamiento no sólo se observaron respecto al grupo vehículo, sino también respecto al grupo control (ANOVA $p=0,009$, *post-hoc* $p=0,018$ y $p=0,041$ respectivamente). No se observaron cambios significativos por el tratamiento farmacológico administrado (VP2.51 o fluoxetina). El análisis *post-hoc* de Bonferroni determinó que sólo existían diferencias significativas entre el grupo control y el VP2.51 ($p=0,039$).

Conclusiones: El número total de neuronas granulares del GD no se vió alterado ni por el protocolo UCMS, ni por los tratamientos farmacológicos. Sin embargo el tratamiento con VP2.51 y fluoxetina incrementará significativamente la densidad de neuronas granulares respecto a los grupos control y vehículo.

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 5:

**Efectos adversos y fenotipado conductual en
animales tratados crónicamente con el inhibidor
VP2.51.**

Las quinasas son un tipo de enzima que transfiere grupos fosfato desde el ATP a un sustrato específico o diana. Este proceso se llama fosforilación y es uno de los principales mecanismos de regulación celular, tanto de cascadas metabólicas, como de actividad enzimática. La fosforilación puede causar actividad o inactividad de la diana.

El VP2.51 es un inhibidor de la GSK-3 ATP-competitivo. Aunque el panel de quinasas ha mostrado una alta especificidad (ver resultados: Estudios previos con el VP2.51: Diseño y síntesis y estudios *in vitro*. 1.3 Evaluación enzimática), no podemos descartar que el inhibidor esté interaccionando con otras quinasas.

Además, hay que tener en mente que la GSK-3 es una quinasas muy conservada en el reino animal. A diferencia de otras quinasas, la GSK-3 es constitutivamente activa en condiciones normales y en respuesta a cascadas metabólicas se inhibe su actividad. Estos dos hechos sugieren que la GSK-3 tiene implicaciones funcionales en nuestros sistemas que no podemos obviar cuando utilizamos inhibidores de la enzima.

Por todo ello, en este capítulo nos planteamos estudiar si la inhibición de la GSK-3 mediante la administración del inhibidor ATP-competitivo VP2.51, durante un periodo máximo de 8 semanas (más del doble de nuestro tiempo de tratamiento en el resto de experimentos) y a una dosis de 2,5 mg/kg puede producir algún efecto adverso en los animales tratados. Se evaluó la actividad normal así como el aprendizaje y la memoria a largo plazo de los ratones.

Como se observa en la figura 63, se trató a los animales durante 8 semanas con el VP2.51 o vehículo. A lo largo de este tiempo se realizaron diferentes pruebas comportamentales. Se evaluó la actividad normal con una jaula de actividad (AC, del inglés Activity Cage). La memoria a largo plazo se evaluó con un reconocimiento de objetos (NOR, del inglés Novel Object Recognition), una evitación pasiva (PA, del inglés Passive Avoidance) y un laberinto acuático (MWM, del inglés Morris Water Maze).

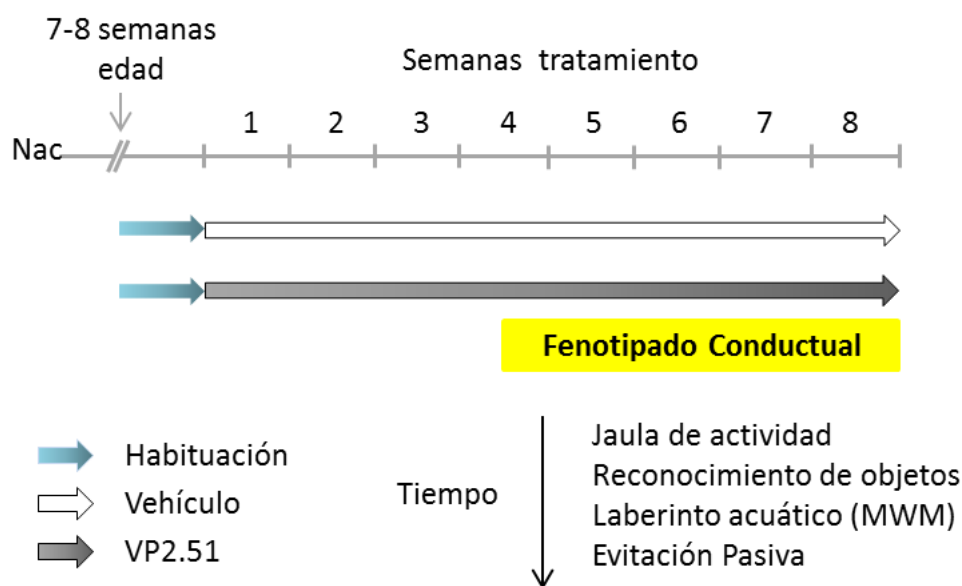


Figura 63: Diseño experimental para el estudio de efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados VP2.51 crónicamente.

1. Peso corporal y ganancia en peso.

Se monitorizó el peso corporal durante las 8 semanas de tratamiento con el fin de estudiar si tratamientos más prolongados en el tiempo alteraban de manera significativa la ganancia en peso. Como se explicó en el capítulo “Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta”, la GSK-3 juega un papel principal en el metabolismo energético y su desregulación está implicada en una variedad de desórdenes metabólicos, entre ellos la obesidad y la diabetes tipo 2 (Eldar-Finkelman, Schreyer et al. 1999, Lee, Yang et al. 2013, Datusalia and Sharma 2014).

Como se observa en la figura 64, el tratamiento no alteró significativamente ni el peso corporal, ni la ganancia en peso durante 8 semanas de tratamiento a una dosis de 2,5 mg/kg.

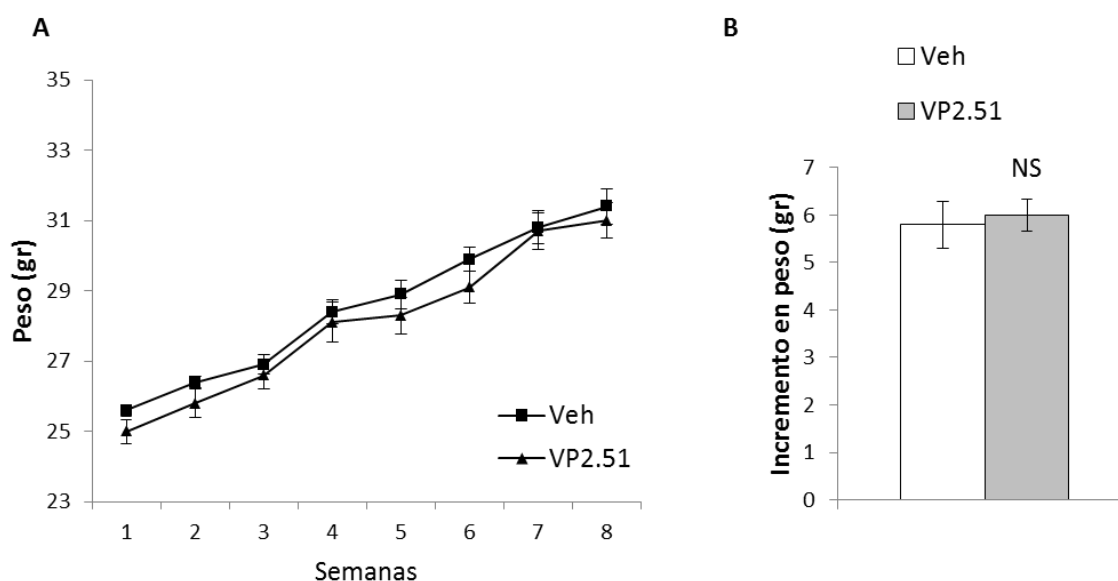


Figura 64: Efecto del tratamiento en el peso corporal (A) y en la ganancia en peso (B) durante 8 semanas de tratamiento a una dosis de 2,5 mg/kg. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (ANOVA de medias repetidas y t-Student respectivamente).

Conclusión: El tratamiento con VP2.51 durante 8 semanas a una dosis de 2,5 mg/kg no alteró ni el peso corporal ni la ganancia en peso.

2. Estudio del efecto del VP2.51 en la actividad normal de un ratón.

La evaluación de la actividad resultó de especial interés, no solo para ver si la actividad normal estaba alterada por el fármaco, sino para consolidar y validar los resultados obtenidos en el FST y TST. Fármacos estimulantes pueden dar falsos positivos en estas pruebas, por ello resulta necesario determinar si el fármaco altera la actividad general (Slattery and Cryan 2012).

Como se observa en la figura 65, el fármaco no alteró significativamente la actividad horizontal, la actividad vertical, el tiempo de movimiento, el tiempo en reposo, la distancia recorrida en los márgenes, la distancia recorrida en el centro, el tiempo transcurrido en los márgenes ni el tiempo en el centro.

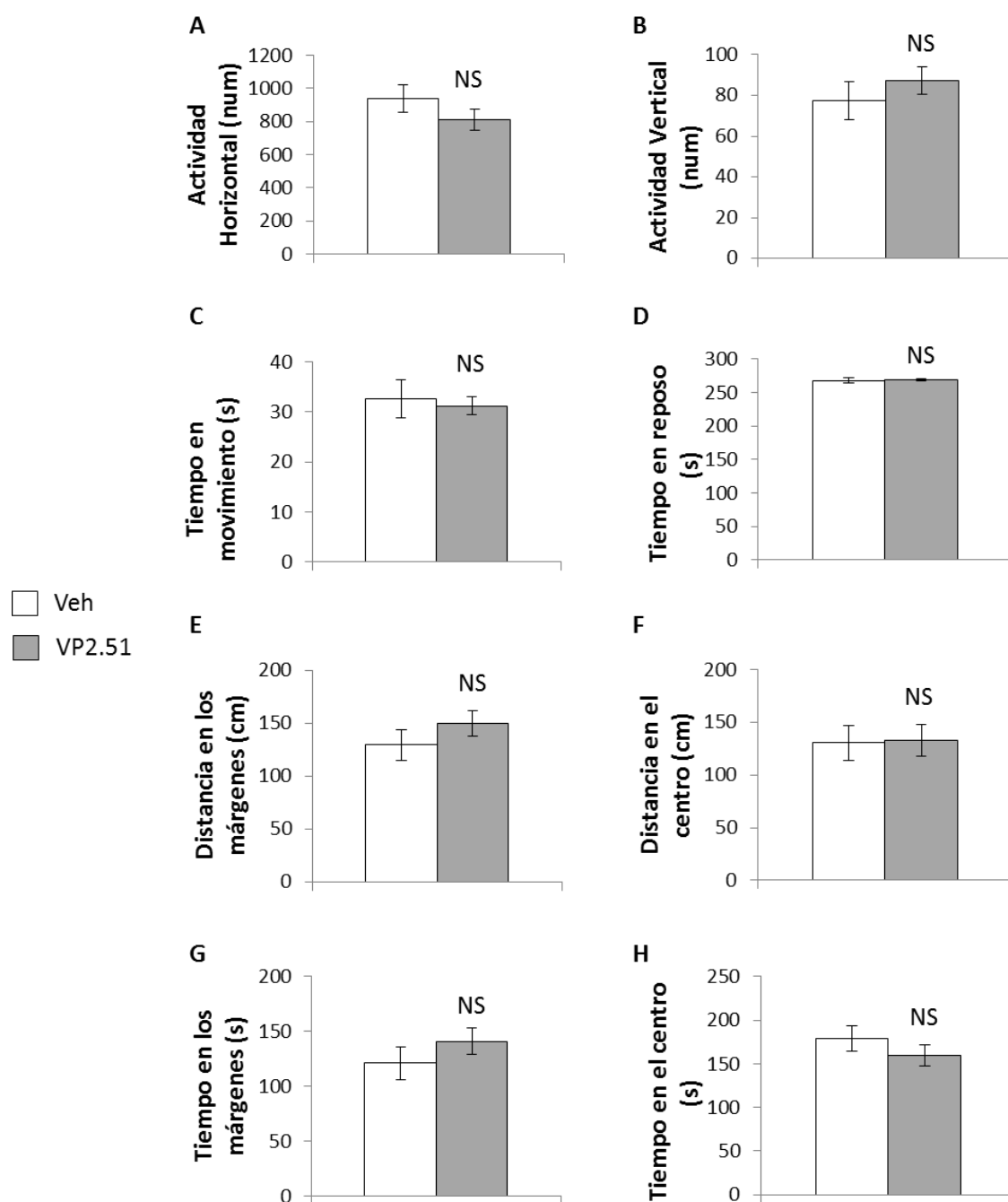


Figura 65: actividad normal medida en una jaula de actividad. (A-H) Se representa la actividad horizontal, la actividad vertical, el tiempo de movimiento, el tiempo en reposo, la distancia recorrida en los márgenes, la distancia recorrida en el centro, el tiempo transcurrido en los márgenes y el tiempo en el centro respectivamente. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

También se han evaluado otros parámetros como son el número de alzamientos, el tiempo de los alzamientos, la actividad estereotípica, el número de estereotipias, el tiempo de las estereotipias, las rotaciones a la derecha y las rotaciones a la izquierda. Ningunos de estos parámetros resultó alterado por el fármaco (tabla 13).

	CTR	VP2.51
Número de alzamientos	36±4	35±3
Tiempo de los alzamientos (s)	28±3	30±3
Actividad estereotípica	48±2	42±3
Número de estereotipias	60±7	42±7
Tiempo de las estereotipias (s)	532±66	384±60
Rotaciones a la derecha	1,8±0,5	1,1±0,3
Rotaciones a la izquierda	1,3±0,3	1,4±0,4

Tabla 13: efecto del VP2.51 en la actividad normal de los animales. Los resultados son la media del grupo experimental con la SEM. Ningún parámetro resultó ser estadísticamente significativo (t de Student).

Conclusión: El tratamiento con VP2.51 no alteró la actividad normal de los ratones. Este resultado contribuye a validar los datos obtenidos en el FST y el TST.

3. Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje y memoria a largo plazo.

La evaluación conductual del aprendizaje y la memoria conlleva intrínsecamente la evaluación cognitiva, ambos procesos están unidos. Para estudiar si el fármaco altera la cognición se realizaron diferentes pruebas conductuales que evaluaron el aprendizaje

y la memoria. En función del tiempo que pasó desde el aprendizaje hasta la evaluación de la memoria podemos diferenciar entre memoria a corto plazo o de trabajo y memoria a largo plazo. La memoria a largo plazo conlleva un proceso de consolidación del aprendizaje y una reactivación de la memoria ya formada el día de la prueba. Además si se refuerza este aprendizaje hablamos de reconsolidación. Para evaluar la consolidación y la reactivación de la memoria se realizaron un NOR y un PA y un MWM clásico. Para evaluar la reconsolidación de la memoria se utilizó un MWM de 4 días. Además se dejaron descansar los animales durante 10 días y a continuación se realizó una sesión de adquisiciones que conllevó una reactivación de una memoria ya reconsolidada. A las 24 horas se realizó una sonda.

Se ha descrito en modelos murinos modificados genéticamente, que el ratón heterocigoto $GSK-3\beta^{+/-}$ y el ratón $GSK-3\alpha$ necesitan una actividad normal de la quinasa para la reconsolidación de la memoria y la consolidación respectivamente (Kimura, Yamashita et al. 2008, Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009). Además se ha reportado la importancia de la actividad de $GSK-3\beta$ mediando la interacción entre las dos principales formas de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés Long Term Depression). Es más, la actividad de la $GSK-3\beta$ se incrementa durante la LTD y se inhibe en la LTP (Hooper, Markevich et al. 2007, Peineau, Taghibiglou et al. 2007).

3.1 Estudio del efecto del VP2.51 en la consolidación y reactivación en una prueba de reconocimiento de objetos (NOR).

El NOR es una prueba robusta y sensible para evaluar el efecto de un compuesto en la cognición, aunque generalmente se utiliza para testar fármacos pro-cognitivos (Mathiasen and DiCamillo 2010). Nosotros en este experimento trataremos de evaluar si el fármaco altera la cognición normal de un ratón tras el tratamiento con el VP2.51.

Para esta prueba los ratones inicialmente se habitúan a la cubeta donde se va a realizar la prueba. 24 horas después, se exponen ante dos objetos idénticos y se les permite un tiempo de exploración. Finalmente, al día siguiente se reemplaza uno de

los objetos por un objeto nuevo (Leger, Quiedeville et al. 2013). La preferencia a explorar el objeto nuevo se define por el Índice de discriminación (véase material y métodos 2.7.2 Evaluación de la memoria a largo plazo).

Como se observa en la figura 66, el VP2.51 no modificó significativamente el índice de discriminación.

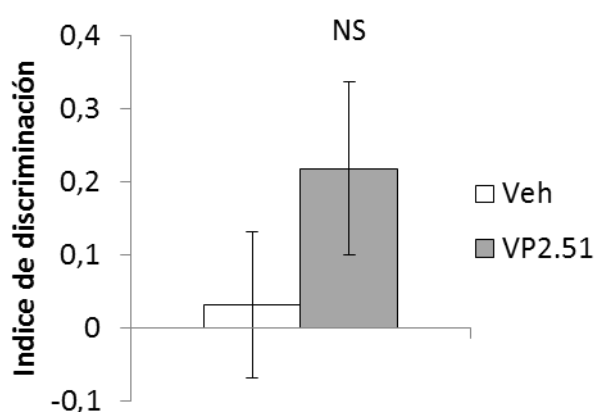


Figura 66: Efecto del VP2.51 en la consolidación y reactivación. El gráfico representa el índice de discriminación en un NOR. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El tratamiento con VP2.51 no alteró ni la consolidación ni la reactivación de la memoria en los ratones evaluados con un NOR.

3.2 Efecto del VP2.51 en la consolidación y en una prueba de evitación pasiva (PA).

La prueba del PA nos permite estudiar un aprendizaje asociativo. El animal se condiciona a un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia. Para llevar a cabo esta prueba se utiliza una caja con dos compartimentos, uno claro y otro oscuro, separados entre sí por una puerta corredera. En el compartimento claro hay una luz potente, mientras en el oscuro hay un circuito que producirá una pequeña descarga eléctrica. En esta prueba se pretende que el animal

aprenda a evitar el compartimento oscuro donde se aplica la descarga (Kameyama, Nabeshima et al. 1986).

Para evaluar el aprendizaje y la memoria se evaluaron las latencias de escape en la habituación, entrenamiento y la prueba. Las diferentes pruebas se realizaron en días consecutivos. Como se puede observar en la figura 67 el tratamiento no alteró ni la consolidación ni la reactivación de la memoria.

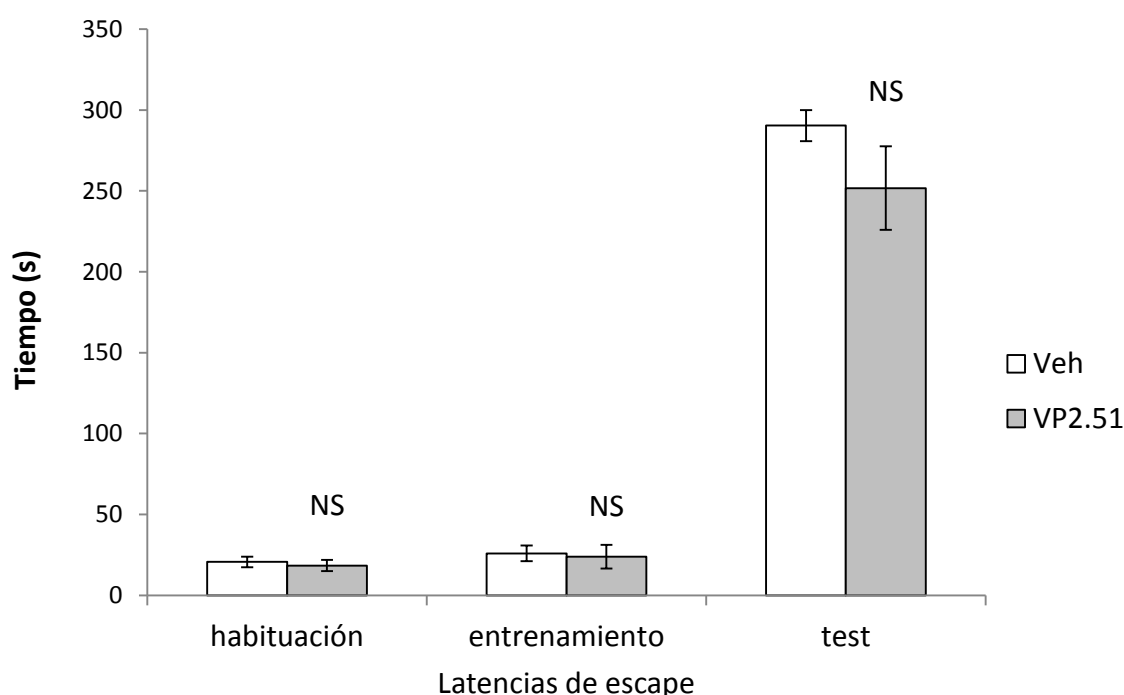


Figura 67: Efecto del tratamiento del VP2.51 en consolidación y reactivación de la memoria. Se muestran las latencias de escape en la habituación, entrenamiento y prueba. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El tratamiento con VP2.51 no alteró ni el aprendizaje ni la memoria a largo plazo asociativa en los ratones evaluados con una prueba de evitación pasiva.

3.3 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo.

En el capítulo “Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en conductas hipocampo-dependientes” en el apartado “1. Efecto del VP2.51 en el aprendizaje espacial” describimos que el fármaco no tuvo efectos pro-cognitivos en el aprendizaje espacial en un MWM de un día.

En este sub-apartado trataremos de evaluar si el fármaco tiene algún efecto negativo en el aprendizaje y la memoria hipocampo-dependiente. Para ello realizamos un MWM de 4 días, que nos permitió testar la consolidación del aprendizaje, la reactivación de la memoria y la reconsolidación durante las adquisiciones de los 4 primeros días. Cada día de adquisición constó de 4 ensayos, uno por cada entrada de la piscina. Se consideró que conocían la posición de la plataforma cuando se obtuvieron latencias de escape menores de 20 segundos. Con el fin de dificultar la prueba y desenmascarar posibles alteraciones no detectables en una prueba de 4 días, se dejaron descansar los animales durante 10 días y en el día 11 se realizó una nueva sesión de adquisición. Para finalizar la prueba se realizó una sonda 24 horas después de las adquisiciones del día 11 (para más información véase material y métodos 2.6.2 MWM clásico con evaluación del aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo).

Como se observa en la figura 68, el tratamiento no alteró ni el aprendizaje, ni la consolidación, ni la reactivación, ni la reconsolidación durante las 4 primeras adquisiciones. Tampoco se observaron cambios en la reactivación de la memoria tras 10 días de descanso. Los datos de la sonda nos demuestran que los animales aprendieron y memorizaron correctamente la posición de la plataforma.

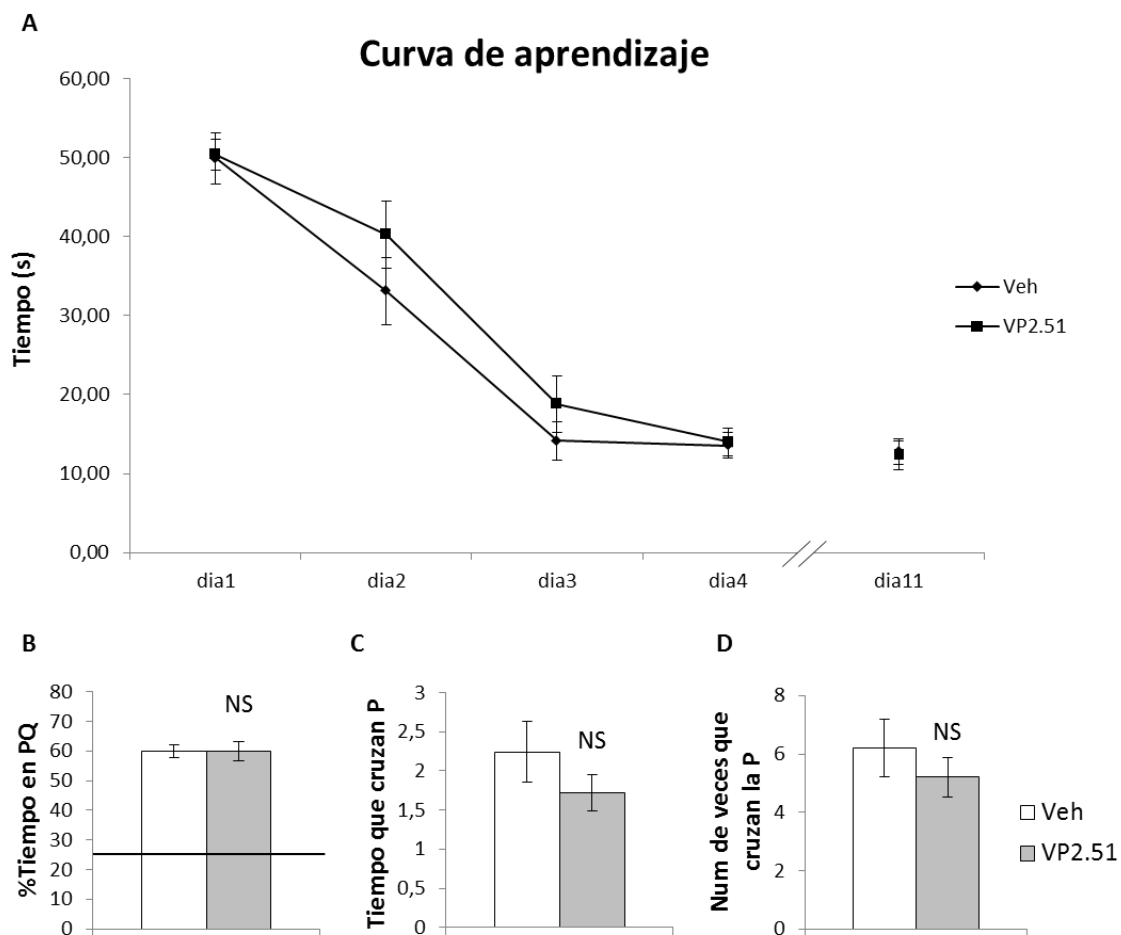


Figura 68: Efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de una memoria a largo plazo. (A) Curva de aprendizaje. Como se puede observar en la curva de aprendizaje, el fármaco no alteró el aprendizaje ni a corto ni a largo plazo. **(B)** % del tiempo en el cuadrante de la plataforma en la sonda. Se representa con una línea el 25%, que corresponde al porcentaje al azar de estar en el cuadrante durante la prueba. **(C)** Tiempo que pasa cruzando la posición virtual de la plataforma en la sonda. **(D)** Número de veces que cruzan la posición virtual de la plataforma en la sonda. PQ cuadrante de la plataforma, P plataforma. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. NS no significativo (t de Student).

Conclusión: El tratamiento con VP2.51 a una dosis de 2.5 mg/kg no alteró ni el aprendizaje, ni la consolidación, ni la reactivación, ni la reconsolidación de los ratones en la prueba de aprendizaje espacial MWM.

Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51.

Objetivo 6:

Mecanismo de acción del VP2.51.

Hasta ahora hemos demostrado cómo el VP2.51, un inhibidor de GSK-3 es un antidepresivo potencial y que su mecanismo de acción, a nivel celular, esté posiblemente mediado por un efecto proneurogénico en la SGZ de la formación hipocampal.

El mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos, o es desconocido, o existen varias hipótesis de posibles mecanismos de actuación. El mecanismo de actuación de litio es desconocido (Vademecum 2013), sin embargo existen numerosos artículos de investigación que describen a nivel neuronal una reducción de la neurotransmisión excitatoria (dopamina y glutamato) y un incremento de la neurotransmisión inhibitoria (GABA). A nivel intracelular y molecular se ha visto un gran número de mecanismos putativos de modulación como son la GSK-3, la HDAC-1, la PKC y las vías IP3 entre otros (Malhi, Tanious et al. 2013). Esto nos indica lo complejo que resulta en muchos casos conocer con exactitud el mecanismo de acción.

El VP2.51 es un inhibidor selectivo ATP-competitivo de la GSK-3. Creemos que su mecanismo de acción, a nivel molecular, está mediado por la actividad de la GSK-3, sin embargo no podemos descartar que no esté alterando otras dianas como efecto de la propia inhibición de la GSK-3 o como interacción directa con otras dianas. Sin embargo hasta ahora no hemos visto si realmente hay una inhibición de la quinasa en tejido cerebral.

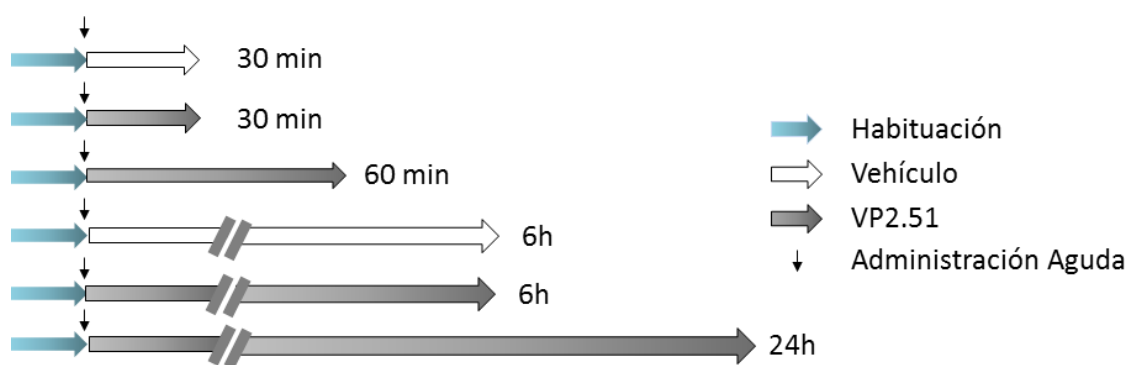


Figura 69: Grupos experimentales con tratamiento agudo. El periodo de habituación se representa en azul, los grupos tratados con VP2.51 en gris, y los controles en blanco. Las flechas negras indican la inyección de fármaco/vehículo.

Aunque los estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Ana Martínez, del Instituto de Química Médica del CSIC, demostraron que el fármaco era capaz de atravesar la BHE, en este capítulo quisimos evaluar el efecto inhibitorio del VP2.51 de la GSK-3 β en tejido cerebral adulto. Para ello se inyectaron 30 ratones a diferentes tiempos como se indica en la figura 69. Se analizaron por WB muestras de hipocampos y corteza prefrontal medial (mPFC).

Dado que el VP2.51 es un inhibidor competitivo del ATP, en principio no sería esperable ver alteraciones en la forma inactiva p-GSK-3 β (ser9) por ello se decidió analizar si había alteraciones en su sustrato, la β -catenina, en muestras de hipocampo y corteza prefrontal.

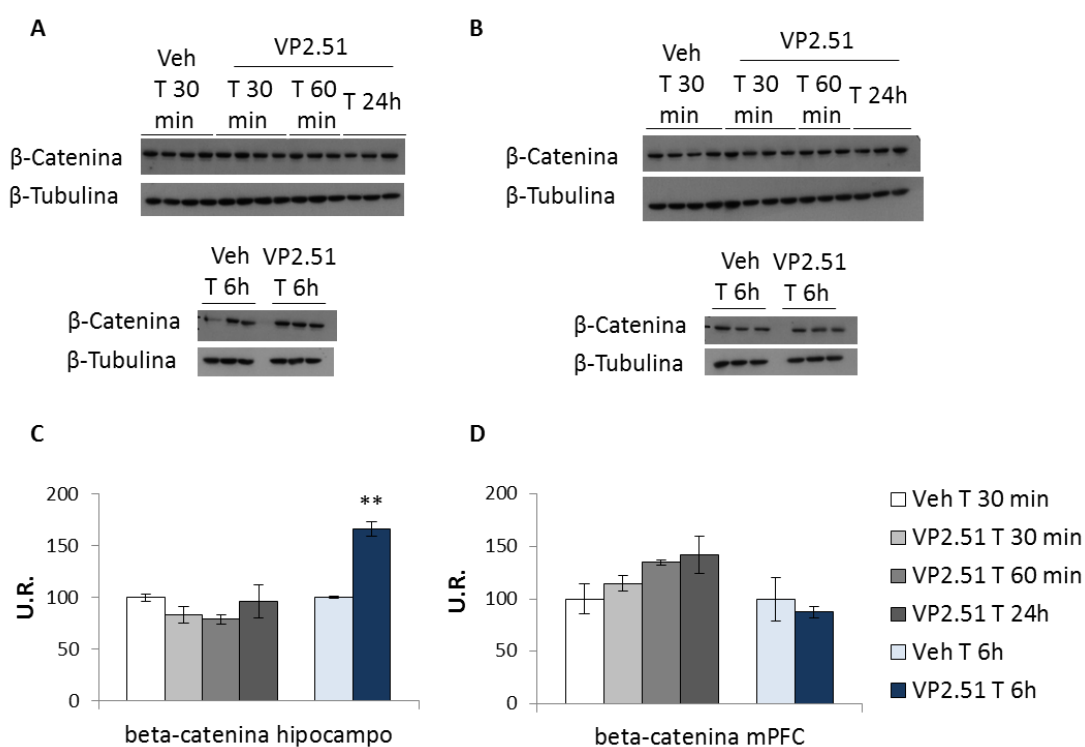


Figura 70: Efecto del inhibidor VP2.51 en la cantidad de β -catenina a diferentes tiempos de administración. (A-B) Se muestran las bandas obtenidas para la β -catenina en tejido hipocámpal y de la mPFC respectivamente. **(C-D)** Histogramas con el efecto del VP2.51 en la cantidad de β -catenina en muestras de hipocampo y mPFC respectivamente. Los datos se representan respecto al 100% del grupo Veh. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. ** $p < 0.01$ Grupo Veh 30 min, VP2.51 30 min, VP2.51 60 min y VP2.51 24h Anova. Grupo Veh 6h y VP2.51 6h t de Student.

Como se puede observar en la figura 70, el VP5.51 indujo un incremento de la β -catenina a las 6h de la administración respecto del vehículo ($p=0,006$). Este fenómeno no se observó en las muestras de tejido de la mPFC.

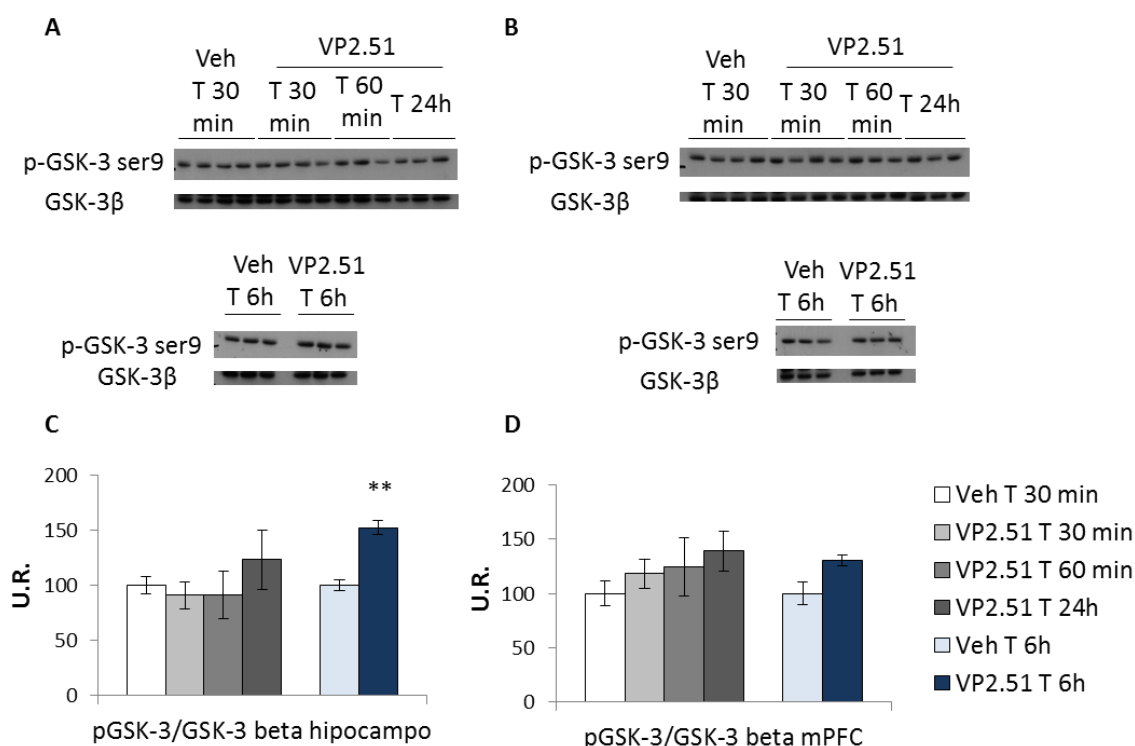


Figura 71: Efecto del VP2.51 en la cantidad de pGSK-3 (ser 9) a diferentes tiempos de administración. (A-B) Se muestran las bandas obtenidas para la pGSK-3 β (ser9) en tejido hipocámpal y de la mPFC respectivamente. **(C-D)** Histogramas con el efecto del VP2.51 en la cantidad de pGSK-3 β (ser9) en muestras de hipocampo y mPFC respectivamente. Los datos se representan respecto al 100% del grupo Veh. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. ** $p<0.01$ Grupo Veh 30 min, VP2.51 30 min, VP2.51 60 min y VP2.51 24h Anova. Grupo Veh 6h y VP2.51 6h t de Student.

Aunque no parece evidente que un fármaco ATP competitivo altere las concentraciones de la pGSK-3 β (Ser 9) ni de la GSK3 total, existen numerosos mecanismos compensatorios que pueden o bien equilibrar la falta de actividad de la GSK-3 β incrementado la síntesis de GSK-3 β y/o GSK-3 α , o amplificar la señal

incrementando la inhibición por fosforilación del residuo Ser-9. Para ello se realizaron *western blots* (WB) con las muestras de hipocampo y corteza prefrontal medial y se midió tanto la p-GSK-3 β como la GSK-3 total (α y β).

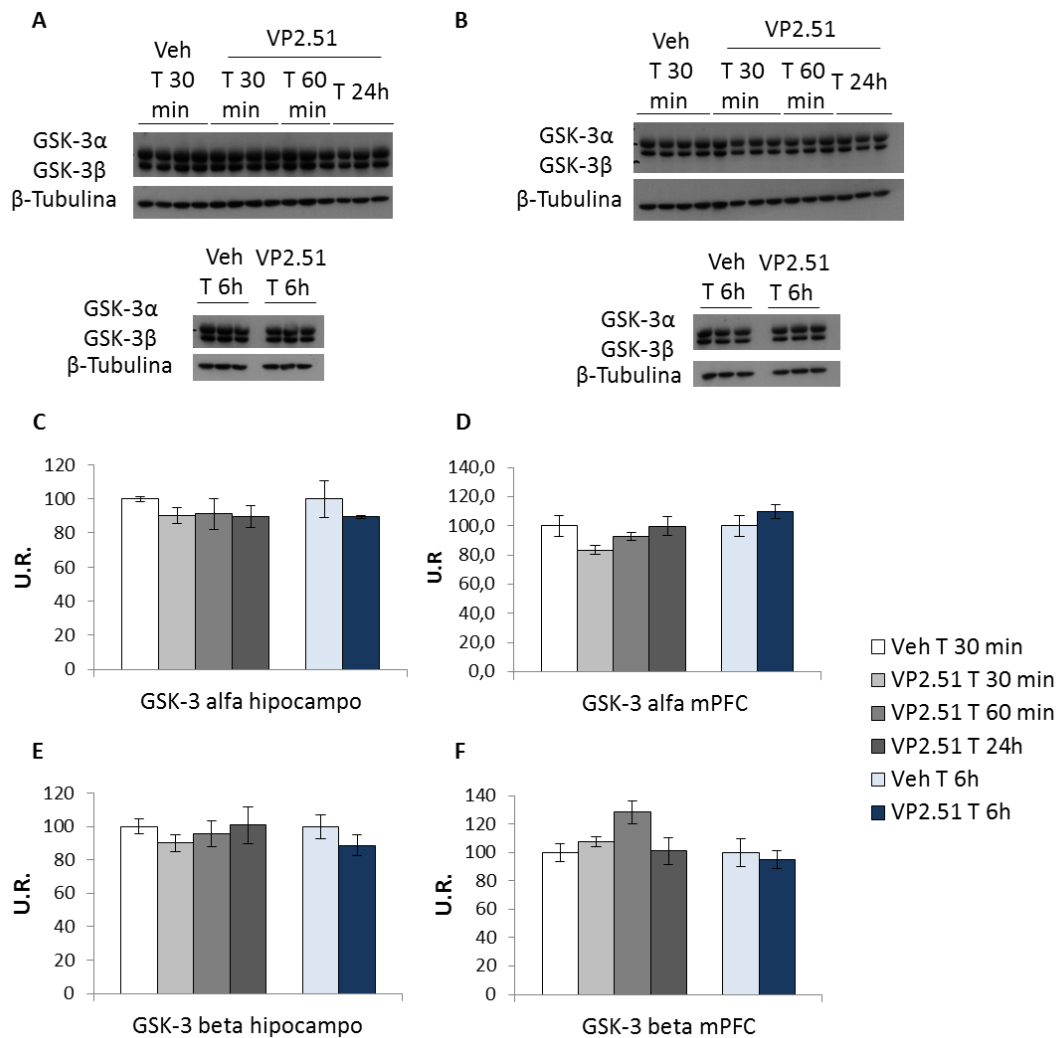


Figura 72: Efecto del VP2.51 en la cantidad de GSK-3 α y GSK-3 β a diferentes tiempos de administración. (A-B) Se muestran las bandas obtenidas para la GSK-3 α y GSK-3 β en muestras de tejido hipocampal y mPFC respectivamente. **(C-D)** Histogramas con el efecto del VP2.51 en la cantidad de GSK-3 α y GSK-3 β en muestras de hipocampo respectivamente. **(E-F)** Histogramas con el efecto del VP2.51 en la cantidad de GSK-3 α y GSK-3 β en muestras de mPFC respectivamente. Los datos se representan respecto al 100% del grupo Veh. Los resultados son la media del grupo experimental y la barra de error es la SEM. Ningún grupo resultó significativo. Grupo Veh 30 min, VP2.51 30min, VP2.51 60 min y VP2.51 24h Anova. Grupo Veh 6h y VP2.51 6h t de Student.

Los resultados del WB indican que el VP2.51 incrementó significativamente la forma inactiva de la GSK-3 a las 6h de tratamiento en tejido hipocampal ($p=0,003$). En mPFC hubo una tendencia a incrementar la p-GSK3 ($p=0.059$) (figura 71). La cantidad total de GSK-3 α y β no se vio afectada por el uso del inhibidor (figura 72).

DISCUSIÓN

1. Consideraciones técnicas.

Consideramos de especial relevancia, en esta tesis doctoral, tanto los métodos de estimación para cuantificar el número total de células como los diferentes enfoques experimentales para evaluar el efecto antidepressivo del fármaco. Por estas razones dedicaremos la primera sección a discutir las consideraciones técnicas.

1.1 Estimaciones de número total de células.

La inmunohistoquímica se refiere al proceso por el cual detectamos determinados antígenos (marcadores) en las células de un corte histológico. El uso de marcadores específicos nos permite estudiar determinados eventos, como son la proliferación, o la posibilidad de marcar de forma específica diferentes poblaciones y/o subpoblaciones celulares.

Para comprender un proceso biológico es fundamental realizar cuantificaciones lo más cercanas a la realidad. Lo ideal sería cuantificar la estructura completa, de manera que nuestra cuantificación sólo tuviera el error producido por la técnica y el error del experimentador. Sin embargo esto no resulta factible por dos razones. En primer lugar, necesitaríamos un animal para cada inmunohistoquímica y actualmente la legislación de bien estar animal nos obliga a respetar las tres R (Reemplazar, Reducir y Refinar, Russel y Brunch 1959); y en segundo lugar, la cantidad de tiempo y esfuerzo sería inasequible.

Las técnicas estereológicas emergieron para solventar estos problemas. La estereología es definida como un conjunto de métodos útiles para obtener información cuantitativa de carácter geométrico-estadístico de un objeto de interés, a partir de secciones del objeto (Haug 1986, Cruz-Orive 1987). En general, los métodos estereológicos tienen una serie de ventajas metodológicas y prácticas. Como ventajas metodológicas podemos destacar por un lado, que son métodos insesgados, carentes de error sistemático, y por otro que la estimación de los parámetros no está influida ni

por la forma del objeto, ni por su distribución y/o tamaño. Además, una clara ventaja metodológica y práctica es que los métodos estereológicos son altamente eficientes. Con una muestra pequeña de sujetos y pocas secciones (alrededor de 6-7 secciones) se obtienen coeficientes de error y de variación aceptablemente bajos (Royet 1991, West 1993).

En función de la densidad de las partículas que queramos cuantificar, se utilizarán diferentes estrategias estereológicas.

1.1.1 Estimación del número total con una baja densidad de partículas. El fraccionador.

La técnica del fraccionador se basa en cuantificar una fracción de la muestra de interés (West, Slomianka et al. 1991). Nuestras fracciones están compuestas de cortes seriados del hipocampo y cada fracción será 1/8 del hipocampo. Esto nos asegura una buena representación de toda la estructura. Para asegurarnos que todas las fracciones de la estructura tienen la misma probabilidad de ser muestreadas, cada animal comenzó a seccionarse a distancias variables del comienzo del hipocampo.

Para utilizar esta metodología es necesaria una baja densidad de partículas. Los marcadores que se evaluaron con el fraccionador fueron la pH3, Ki67, la BrdU, la CldU y la IdU. Se cuantificó el número de partículas positivas, para nuestro marcador de interés, en todo el grosor de la sección, con ayuda de un microscopio óptico. Finalmente se multiplicó el número obtenido, por el número de fracciones.

El método del fraccionador nos ofrece numerosas ventajas a la hora de trabajar; por un lado, los problemas de alteración del volumen del tejido debido a su procesamiento no influyen en las estimaciones. Además de que no es necesario conocer el volumen exacto de la estructura. Esto nos permite eliminar numerosas fuentes de error en nuestras estimaciones. Se considera que cuantificando en cada individuo un número de 100-200 partículas, es suficiente para obtener unos coeficientes de error aceptables para los estudios histológicos.

Esta estrategia estereológica del fraccionador para cuantificar análogos de timidina (BrdU, CldU e IdU), así como las células Ki67⁺ y pH3⁺ está ampliamente utilizada en el

campo (Jessberger and Kempermann 2003, Kempermann, Gast et al. 2003, Kuhn, Biebl et al. 2005, Koehl, Meerlo et al. 2008, Leuner, Glasper et al. 2009). Sin embargo existen discrepancias en el número de fracciones. Los diferentes autores fraccionan el hipocampo entre 6 y 12 series. En el trabajo presentado en esta tesis se han fraccionado siempre los hemisferios en 8 series, obteniendo mayoritariamente un número de partículas superior a 100. Cuando esto no resulta posible por la baja densidad de células positivas (por ejemplo la pH3) una forma de aumentar la sensibilidad estadística, sin aumentar el número de secciones es aumentar el número de animales. Nuestras N fueron lo suficientemente altas como para obtener coeficientes de variación aceptables en todas las cuantificaciones.

1.1.2 Estimación del número total con una alta densidad de partículas. El disector.

Tanto las células granulares (Prox1⁺), como las subpoblaciones inmaduras (DCX y Calret positivas) presentan una alta densidad celular en el giro dentado. Para cuantificar el número total de estos marcadores se requiere del uso de disectores. Los disectores son espacios, de área o volumen conocido, que se disponen sobre nuestra estructura de interés y limitan el espacio de conteo. Para obtener el número total de partículas es fundamental conocer el volumen de la estructura. Existen dos tipos de disectores, los disectores físicos y los disectores ópticos (figura 73).

El disector físico es un método de seccionamiento serial sin reconstrucción para la estimación del número de partículas. Como su nombre indica, utiliza dos secciones seriales separadas con una distancia conocida suficientemente pequeña para deducir lo que queda entre ambas secciones. Aunque existen disectores con formas muy variadas, en función de la estructura de la partícula que vayamos a cuantificar, en nuestro caso vamos a utilizar un disector cuadrado simple, de tamaño conocido.

El disector óptico es una extensión del método básico del disector físico, que se aplica a una sección gruesa usando el micrométrico de un microscopio acoplado a un software de estereología. Este disector incorporará al disector físico una profundidad.

Los tamaños de los disectores, así como el número de disectores se determinan en función de la homogeneidad de la distribución de las partículas a lo largo de la estructura y el tamaño en relación con la morfología de la partícula según el homograma de Gundersen y Jensen (Gundersen and Jensen 1987).

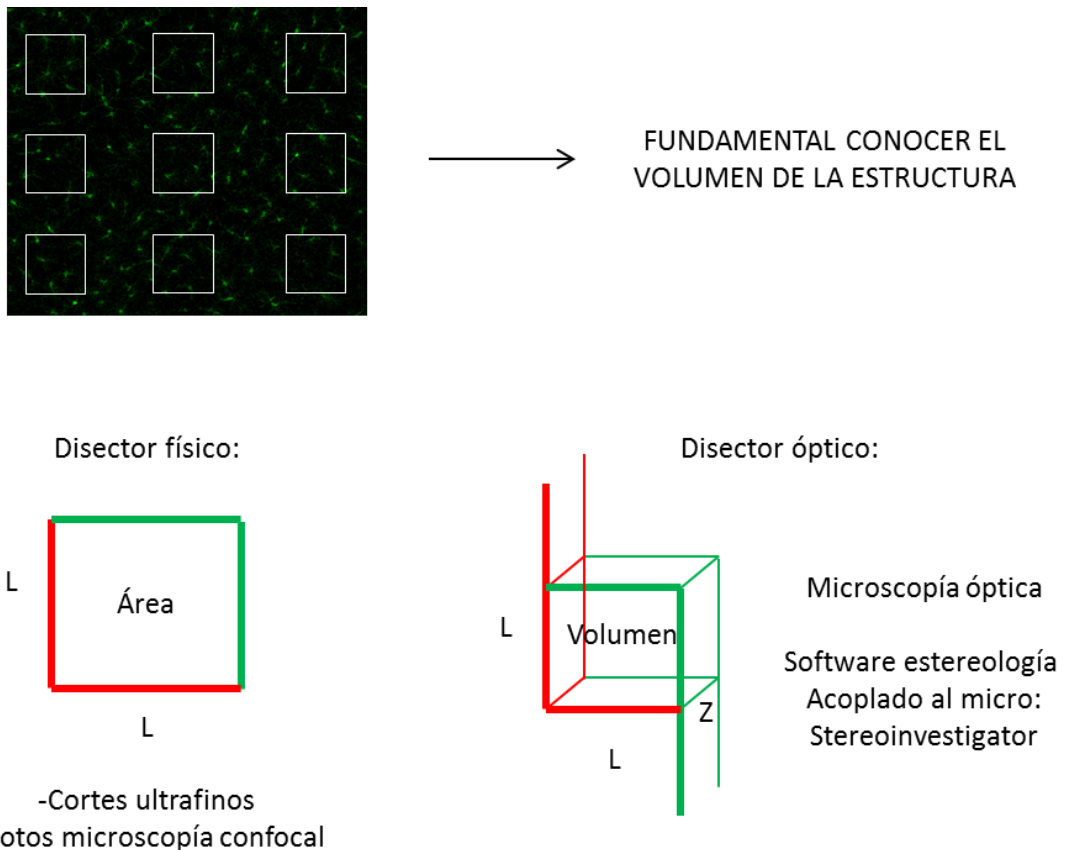


Figura 73: Disposición de los disectores sobre una estructura a cuantificar. En el ejemplo las partículas de interés son las aceitunas. Esquema de los dos tipos de disectores. Se representa en rojo los límites no permisivos y en verde los límites permisivos. L laterales de distancia conocida y Z profundidad de distancia conocida.

1.1.2.1 El disector físico.

El método del disector físico resulta de gran utilidad cuando las células tienen un alto grado de empaquetamiento, siendo el caso de las células granulares Prox1⁺. Comparado con otros métodos, este método es más riguroso puesto que evita errores de sobre y sub estimación.

Existe la alternativa del uso del disector óptico para cuantificar las células. El disector óptico es una extensión del método básico del disector físico, que se aplica a una sección gruesa usando el micrométrico de un microscopio acoplado a un software de estereología. Atendiendo a los aspectos relacionados con las propiedades ópticas de los microscopios, cabe señalar que el objetivo de máximo aumento que disponemos es un objetivo de 100 aumentos de inmersión y debido al alto empaquetamiento de las células en el GD sería necesario cortes de un grosor máximo de 15 μm de para poder llevar a cabo el conteo con rigurosidad. Esto plantea una serie de problemas intrínsecos en la técnica. Los cortes finos requieren que el tejido esté incluido en parafina y/o se seccionen con el criostato. Ambas técnicas requieren de la congelación del tejido. El proceso de congelación está reñido con ciertas técnicas inmunohistoquímicas e imposibilita trabajar con tejido fresco. Por estas razones consideramos, que aunque la técnica del disector físico requiere una inversión de tiempo en la toma de imágenes y posterior cuantificación, y de dinero por el uso del confocal como herramienta de trabajo, resulta de especial utilidad en nuestro trabajo.

Trabajos previos han proporcionado datos del número total de células granulares en el GD con diferentes técnicas de conteo. Los resultados obtenidos con el empleo del disector óptico han revelado datos altamente discordantes. Mientras Kempermann ha reportado 239.000 neuronas granulares maduras (Kempermann, Kuhn et al. 1997), Abusaad determinó una media de 433.000 (Abusaad, MacKay et al. 1999). Nuestros resultados cuadriplican los valores de Kempermann y duplican los de Abusaad. Creemos que los resultados tan dispares entre los dos autores se deben los diferentes grosores (Llorens-Martin, Rueda et al. 2010) utilizados en las secciones y el objetivo utilizado. Mientras Kempermann utiliza secciones de 40 μm y un objetivo de 60X, Abusaad utiliza secciones de 16 μm y un objetivo de 100X. La disparidad con nuestros resultados la atribuimos a una subestimación de los autores debido a la complejidad de cuantificar, de manera rigurosa, una población altamente empaquetada con un

microscopio óptico. Cabe destacar que los resultados aquí mostrados replican datos previos del grupo (Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2006, Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2010, Llorens-Martin, Rueda et al. 2010).

1.1.2.2 Disector físico en U.

El método del disector físico en U es un método de muestreo y de recuentos celulares desarrollado y publicado en nuestro laboratorio (Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2006). Este método está basado en la distribución no homogénea de las subpoblaciones inmaduras en el giro dentado. Los resultados obtenidos de los recuentos han resultado altamente reproducibles, fiables y aceptados por la comunidad científica (Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2006, Llorens-Martin, Rueda et al. 2007, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2010, Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2010, Llorens-Martin, Rueda et al. 2010, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011, Llorens-Martin and Trejo 2011, Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013).

Como se puede observar en la figura 74, las células DCX y Calret no se distribuyen de manera homogénea a lo largo del giro dentado, sino que se posicionan mayoritariamente a lo largo de la SGZ, donde se generan y posteriormente pueden migrar unas micras para integrarse en la capa granular. Aunque las células que se generan en la SGZ se integran completamente en la capa granular llegando a ocupar las regiones más externas, estas subpoblaciones inmaduras tienen mayoritariamente limitada su ubicación a lo largo de la SGZ y ocasionalmente se extienden en la capa molecular. Esto hace necesario el diseño de un disector que se ajuste a esta distribución espacial. El disector físico en U debe su nombre a su forma, una U, cuya base es paralela a la SGZ. Los brazos de la U limitan el disector perpendicular a la SGZ. El disector en forma de U permite la cuantificación de las células inmaduras con independencia de si su distribución se acota a la SGZ, o si por el contrario, ocasionalmente, se extiende en la capa granular. Se trata de un disector físico ya que las imágenes no tienen continuidad física entre sí. Los diferentes planos se toman con ayuda de un microscopio confocal. La profundidad (Z) del stack corresponde al área de referencia de SGZ por el que vamos a referir el número de células inmaduras. También hemos desarrollado un protocolo especial para muestreo aleatorio de los stacks. El

hipocampo es una estructura con su eje longitudinal curvado en las tres dimensiones del espacio, de rostral a caudal, de dorsal a ventral, y de medial a lateral. Cuando el cerebro es seccionado de forma coronal, la región del hipocampo caudo-temporal aparece transversal al eje de la sección, mientras que la región rostro-septal aparece paralela. El resultado es un mayor número de cortes que contienen regiones rostrales, frente a un menor número de cortes que representan regiones más temporales. Estos hechos pueden originar un desequilibrio en la importancia que se le atribuye a cada una de las regiones a la hora de realizar el muestreo. Sin embargo nuestro método de muestreo permite el correcto balance de todas las regiones de interés, con el fin de generar un método no sesgado a lo largo de toda la estructura, donde cualquier punto tenga la probabilidad de ser muestreado. Para ello hemos utilizado un sistema de muestro que hemos denominado “sistema de muestro en forma de escalera en espiral”. Este método consiste en que toda la extensión rostro-caudal del GD es considerado un objeto alargado enrollado en su espiral, y que posteriormente es dividida en regiones equidistantes de muestreo. El número de regiones equidistantes viene determinada por el número de disectores que vamos a utilizar. Cada punto de las regiones tendrá la misma probabilidad de ser elegido.

En el disector físico en U se muestrearon 6 disectores en U por animal, 3 suprapiramidales y 3 infrapiramidales, a lo largo de las regiones de la “escalera de espiral” con una base de 100 μm y una profundidad de 17 μm . Cada stack contó de 11 imágenes.

Para obtener el número total es necesario conocer el área total de la SGZ. Para ello realizamos una modificación de la técnica de Cavalieri. A partir de una tinción Nissl y con ayuda de una platina motorizada y una tableta digitalizadora se dibujó la longitud de la SGZ. El área total de SGZ se calculó multiplicando la longitud de la SGZ por la distancia entre los cortes seriados.

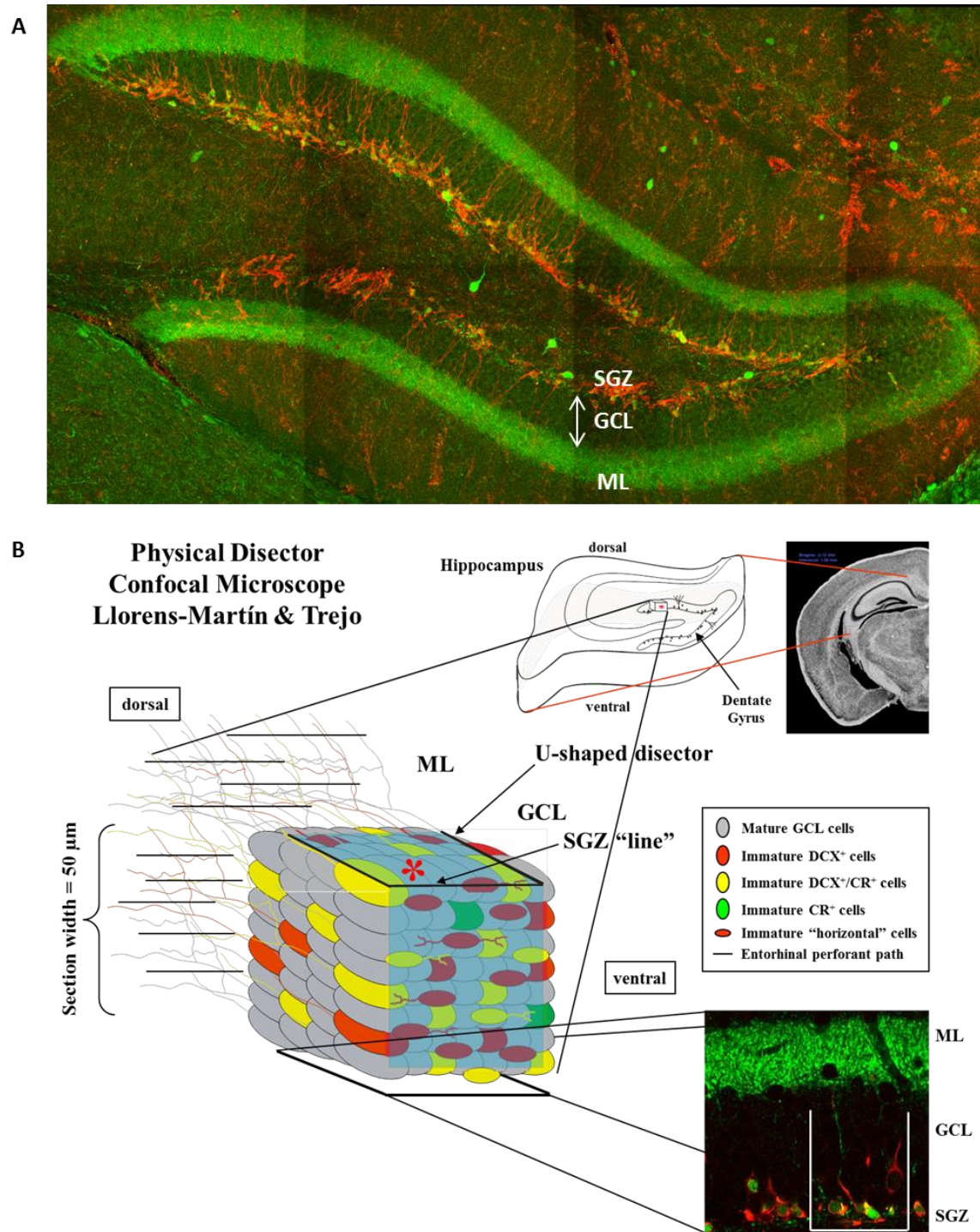


Figura 74: Disector físico en U. (A) Imagen de microscopia confocal representativa de la distribución de las subpoblaciones inmaduras en el GD, en rojo la células DCX⁺ y en verde las células Calret⁺. **(B)** Esquema ilustrativo del disector físico en U desarrollado en el laboratorio. SGZ zona subgranular; GCL capa granular t ML capa molecular.

El número total de células inmaduras se calculó multiplicando el número de células de cada subpoblación partido del área de SGZ del stack por el área total de SGZ.

$$\frac{\text{Número de Células positivas}}{\text{Área Stack}} * \text{Area total de SGZ} = \text{Número total de Células}$$

1.1.2.3 Disector físico direccionado.

El disector físico direccionado se utilizó en el estudio de linaje neural del capítulo Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta, en el subapartado 1.2.2 Efecto del VP2.51 en la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas *de novo* en el giro dentado de la formación hipocampal. Este disector se caracteriza porque en contraposición de lo habitual, no se realiza un muestro aleatorio, sino direccionado. Esto se debe a dos razones principalmente. La primera se basa en las diferentes densidades de partículas de los dos marcadores a estudiar. Mientras el marcador Prox1 tiene una alta densidad de partículas en el GD, la BrdU tiene una baja densidad. De tal forma que si ponemos disectores al azar la probabilidad de encontrar células dobles es muy baja, aumentando significativamente el tiempo de toma de imágenes suficientes para tener un error aceptable. Y la segunda y más importante, es que en esta cuantificación no buscamos el número total, donde el muestreo direccionado podría estar sesgado, sino que buscamos determinar el porcentaje de colocalización. No nos importa si hay más o menos células BrdU, sino cuantas de éstas son Prox1⁺.

Para el muestreo se realizaron 5 stacks por animal, y un mínimo de 25 células BrdU⁺ por animal.

1.2 Evaluación del efecto antidepresivo del VP2.51.

La depresión es la enfermedad psiquiátrica con más prevalencia siendo a su vez una de las causas predominantes de discapacidad laboral en el mundo entero (OMS 2012). La generación de modelos para estudiar esta enfermedad resulta de extrema

complejidad debido a la naturaleza del trastorno. Sin embargo existen algunos modelos y paradigmas experimentales que han demostrado, en algunos casos ser extremadamente eficientes en la identificación de nuevas moléculas farmacológicas y en otros casos ser un modelo neurobiológico aceptable del trastorno de depresión mayor (MDD, del inglés major depressive disorder) (Hill, Hellemans et al. 2012).

En este punto de la sección de consideraciones técnicas, discutiremos los diferentes pruebas conductuales utilizados en esta tesis para evaluar el efecto antidepressivo del VP2.51, así como la validez del UCMS como modelo de MDD.

Como se explicó en la introducción, actualmente existe una necesidad real en la búsqueda de nuevas dianas y fármacos para el tratamiento de la depresión.

Como se explicó en el apartado de resultados, la GSK-3 β disfuncional parece estar involucrada en la MDD (Jope and Roh 2006, Jope 2011). Con el fin de evaluar la eficiencia antidepressiva del inhibidor (validez predictiva) se realizó una prueba de nado forzado (FST). Esta prueba ha demostrado ser muy fiable en la búsqueda de nuevas moléculas con efecto antidepressivo, ya que evalúa el comportamiento de tipo depresivo (Santarelli, Saxe et al. 2003, Mineur, Belzung et al. 2006, Silva, Mesquita et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013). Mientras en ratas está descrito que es necesario hacer un día de entrenamiento y un segundo día de evaluación (Castagne, Moser et al. 2009), en ratones clásicamente se ha replicado este protocolo, observando que una única sesión resulta suficiente (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). En este primer experimento decidimos realizar y evaluar las dos sesiones, observando que, como está descrito, el día 1 resultó suficiente para evaluar el efecto antidepressivo del VP2.51 (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005, Castagne, Moser et al. 2009). Las diferencias significativas entre el grupo tratado con el VP2.51 y el vehículo nos indicaron que podía tratarse de un buen potencial fármaco antidepressivo.

Para ahondar en el conocimiento del efecto antidepressivo, utilizamos un estrés fuerte (un FST modificado) con la finalidad de generar un comportamiento de tipo ansioso y/o depresivo. Tras este protocolo se comenzó el tratamiento con el VP2.51 y el vehículo (figura 45). Al terminar el periodo de tratamiento se realizó una prueba de

suspensión en cola (TST) para evaluar el efecto terapéutico del fármaco en animales previamente depresivos y/o estresados. En este experimento caben varias consideraciones técnicas.

En primer lugar exponer que el FST no es considerado actualmente un modelo de depresión (Castagne, Moser et al. 2009, Dedic 2011). Sin embargo ha sido considerado por algunos autores como un modelo de comportamiento de tipo depresivo (Porsolt, Le Pichon et al. 1977, Montero-Pedrazuela, Venero et al. 2006, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011). No obstante, existe un debate sobre si la inmovilidad se debe a un comportamiento de tipo depresivo, a un comportamiento inducido por desesperanza o como mecanismo de afrontamiento del estrés. Para intentar resolver parcialmente esta indefinición sobre el efecto del FST, inicialmente decidimos evaluar el efecto del FST modificado en la conducta de tipo depresiva y/o ansiosa. Para ello se realizaron dos experimentos piloto. El primer experimento consistió en estudiar el efecto de FST modificado, en la conducta de tipo depresiva. Para ello se sometió a los ratones a un FST de 10 minutos y unos días después evaluamos con un TST el tiempo de inmovilidad del grupo estresado y/o depresivo y un grupo control. Los resultados mostraron que los ratones del FST manifestaban un mayor tiempo de inmovilidad, es decir de acuerdo al consenso actual en el campo, presentan un comportamiento de tipo depresivo. El segundo experimento consistió en hacer un FST de 10 minutos y realizar un laberinto en cruz (EPM) dos y tres semanas después. Ambos grupos experimentales pasaron menos tiempo en los brazos abiertos que el grupo control, es decir de acuerdo al consenso actual en el campo, presentan una conducta de tipo ansiosa. No se llevó a cabo ningún estudio histológico o molecular, por tanto no evaluamos si existía un correlato neurobiológico con la MDD. Con este protocolo podemos hablar de un comportamiento de tipo depresivo y/o ansioso, no de un modelo de depresión.

El segundo aspecto técnico de especial relevancia fue la evaluación del efecto del tratamiento en la conducta de tipo deprimida y/o ansiosa. Como hemos mencionado anteriormente, el FST es una prueba especialmente indicado para testar la eficacia antidepressiva; sin embargo el empleo de un FST modificado, con el fin de inducir una conducta de tipo depresiva y/o ansiosa, nos imposibilita la reutilización de esta prueba. Está demostrado que la re-exposición a un FST induce un aumento del tiempo

de inmovilidad (Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011), sin embargo no sabemos cuánto de este aumento se debe a la conducta depresiva y/o ansiosa y cuánto se debe a proceso de memoria de la ausencia de escapatoria (Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). Por esta razón se decidió evaluar el efecto del fármaco con un TST. El TST, conceptualmente es idéntico al FST, la única diferencia es que la inmovilidad se produce por suspender al animal por la cola. Una ventaja del uso de esta prueba es que evitamos el estrés que induce la hipotermia.

Con el fin de hacer un estudio lo más completo posible, en el efecto antidepresivo del fármaco, se utilizó el UCMS como modelo de MDD. La finalidad de este experimento era, una vez descrito el efecto antidepresivo potencial y la mejora en la conducta de tipo depresiva y/o ansiosa, determinar el efecto curativo del fármaco en un modelo de MDD y compararlo con la fluoxetina, un antidepresivo comercial.

La depresión es un trastorno complejo y cuyo modelaje en un sistema animal resulta extremadamente complejo. Como se explicó en la introducción la depresión es una patología con síntomas muy heterogéneos y en muchos casos incluso contradictorios (como por ejemplo la ganancia o la pérdida de peso, el insomnio o la hipersonmia). Además los animales no solo carecen de conciencia de *sí mismo*, de auto-reflexión (capacidad autoreflexiva) y de la conciencia sobre otros, sino que también carecen de otros síntomas propios del ser humano como son ánimo depresivo, baja autoestima y de ideación suicida entre otros.

Aunque actualmente no existe el modelo de MDD perfecto, existen dos modelos bastante aceptados por la comunidad científica (Dedic 2011). Ambos modelos están basados en el estrés. La MDD, además de tener un componente genético tiene un componente ambiental. Estas alteraciones ambientales están relacionadas con episodios estresantes que desencadenan un trastorno afectivo (Pezawas, Angst et al. 2005, Ising and Holsboer 2006, Keller, Neale et al. 2007). La exposición al estrés o a experiencias traumáticas supone un fuerte desencadenante en la manifestación de la MDD. Esto sugiere una carencia en las estrategias para afrontar el estrés (Kessler 1997, de Kloet, Joels et al. 2005). Por lo tanto, la depresión es también una patología relacionada con el estrés, y en concordancia, los modelos animales de MDD están

basados en el estrés. El problema viene en determinar qué es exactamente el estrés, en otras palabras, que es un estímulo estresante y qué hace que una respuesta sea estresante. Algunos autores han respondido a esta pregunta y consideran que el estrés fisiológicamente hablando carece de respuesta anticipada o de una recuperación rápida, es decir, es impredecible e incontrolable (Koolhaas, Bartolomucci et al. 2011).

Los dos modelos más aceptados en concordancia con lo anteriormente expuesto son el estrés temprano o privación materna y el UCMS. La decisión de utilizar el modelo de UCMS se basó, no sólo en el elevado número de publicaciones que actualmente utilizan este modelo con fines similares a los nuestros, sino en los efectos directos del protocolo de privación materna en los progenitores del GD. El desarrollo del GD se produce en etapas postnatales. Está descrito que la privación materna induce cambios en la AHN. Mientras algunos autores, describen un incremento neurogénico en el adulto y una ventaja adaptativa ante los eventos estresantes, así como efectos deletéreos a largo plazo (Suri, Veenit et al. 2013), otros autores ven un incremento transitorio de la AHN que posteriormente se reduce (Oomen, Girardi et al. 2009, Oomen, Soeters et al. 2010, Korosi, Naninck et al. 2012). Estos hallazgos nos llevaron a considerar inadecuado, en el marco de nuestro paradigma experimental, el uso de este modelo de MDD.

El modelo del UCMS también llamado CMS se desarrolló en base a estudios clínicos y preclínicos (Katz 1982, Papp, Willner et al. 1991, Willner, Muscat et al. 1992). Consiste en repetidas exposiciones a una batería de estreses suaves que se presentarán de manera impredecible durante un periodo de tiempo (suele oscilar entre 10 y 8 semanas). Esta exposición genera cambios comportamentales en la mayoría de los animales incluyendo la anhedonia y la apatía, aunque algunos animales pueden ser resistentes al estrés (Willner, Moreau et al. 1996, Willner 2005, Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Este modelo tiene un gran valor traslacional, ya que induce cambios moleculares similares a los observados en pacientes depresivos (Hill, Helleman et al. 2012) por esto, es considerado por muchos el modelo más útil para estudiar la MDD y los fármacos antidepresivos. Sin embargo hay que tener en cuenta que su mayor defecto es que es un protocolo poco reproducible de unos laboratorios a otros (Dedic 2011).

Generalmente el estado de anhedonia se analiza con una prueba de preferencia a la sacarosa. En nuestro caso no se pudo llevar a cabo por problemas técnicos.

Nuestro diseño experimental constó de un UCMS durante un periodo de 6 semanas y durante las dos últimas semanas se administró el tratamiento farmacológico. Se monitorizó el peso semanalmente. Como se explicó en resultados, tras una aparente recuperación en la semana dos, se consideró necesario intensificar el protocolo de estrés. Asimismo se observó que los estreses que utilizaban olores o sonidos de predadores sólo resultaban efectivos las 2-3 primeras veces, posteriormente el animal empezó a aprender que no existía riesgo y por tanto dejó de ser incontrolable. Por esta razón cesamos su uso. Los estreses que conllevaban una incomodidad para el ratón, resultaron ser los más efectivos y utilizados. Entre ellos se encontró la ausencia de serrín, el serrín mojado o el ruido.

Finalmente la evaluación del efecto antidepresivo de los tratamientos farmacológicos se llevó a cabo con un FST de una única sesión.

Somos plenamente conscientes de las limitaciones que surgen al tratar un síndrome tan complejo como es la depresión en modelos animales. Sin embargo pensamos que en el trabajo presentado en esta tesis doctoral hemos tratado de validar con el enfoque más competente posible y las herramientas disponibles en el campo, el efecto antidepresivo de un fármaco experimental.

Es cierto que además del FST, el TST y el UCMS existen otros paradigmas experimentales utilizados en el campo para estudiar la depresión. Como hemos discutido previamente, actualmente los modelos de MDD aceptados por la comunidad científica son el UCMS y la privación materna, sin embargo existen algunas pruebas de “validez predictiva” que nosotros no hemos utilizado. Entre ellos están la desesperanza aprendida o la confrontación social. Se decidió no utilizar estos paradigmas por las siguientes razones.

Los roedores macho son territoriales y es habitual encontrar en las cubetas un ratón dominante y el resto de individuos subordinados. Sin embargo este hecho resulta más complejo, porque la eliminación del ratón dominante suele generar la

aparición de uno nuevo. Esto nos demuestra que las cubetas son mezclas heterogéneas de animales dominantes y subordinados. La evaluación del estado depresivo mediante la confrontación social puede estar influenciada por el status de dominancia previo de cada animal dentro de la jaula con respecto a sus congéneres. Esta es la razón principal por la que decidimos no utilizar esta prueba como “validación predictiva” del efecto antidepresivo de nuestro fármaco experimental.

En cuanto a la desesperanza aprendida, inducida mediante el uso de descargas eléctricas, aunque somos consciente que su “validez predictiva” es similar al FST o TST, las consideraciones éticas han pesado en la balanza más que la fiabilidad de un test que tiene un fuerte componente de desorden de estrés postraumático, paralelo al componente de depresión.

2. Efecto VP2.51 en el peso corporal y la ganancia en peso.

Está descrito que la GSK-3 juega un papel principal en el metabolismo energético y su desregulación está implicada en una variedad de desórdenes metabólicos, entre ellos la obesidad y la diabetes tipo 2 (Eldar-Finkelman, Schreyer et al. 1999, Lee, Yang et al. 2013, Datusalia and Sharma 2014). También se ha publicado que el uso de un derivado del 3-hidroxicromona, un inhibidor de la GSK-3, disminuye la ganancia en peso en ratones obesos (Lee, Yang et al. 2013). Por esta razón consideramos fundamental analizar si el fármaco provocaba cambios en el peso de los animales. Los resultados muestran que el tratamiento de hasta 8 semanas a una dosis de 2,5 mg/kg no altera ni el peso ni la ganancia en peso. Este resultado era esperable, ya que nuestro modelo animal eran ratones normales. Sin embargo sería aconsejable realizar más estudios con modelos de ratones con sobrepeso e infrapeso.

3. Estudios *in vivo* del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en la neurogénesis hipocampal adulta y en el comportamiento relacionado con la ansiedad.

Actualmente existe un gran interés en la nueva búsqueda de dianas farmacológicas que nos ayuden a paliar muchas de las patologías que actualmente, o no tienen cura, o necesitan una mejora en la eficiencia de los tratamientos, o los tratamientos producen tales efectos adversos que se hace necesario buscar alternativas terapéuticas.

Con este propósito, decidimos evaluar el efecto del VP2.51 *in vivo*. Los resultados previos habían demostrado que el fármaco poseía un buen perfil en cuanto a su capacidad neurogénica y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

La neurogénesis hipocampal adulta está implicada en varios procesos patológicos como son la depresión, la esquizofrenia, la epilepsia o la demencia de tipo Alzheimer (Zhao, Deng et al. 2008). Sin saber, generalmente, si la alteración en la AHN es causa o efecto de dicha patología. Por las razones anteriormente expuestas nos pareció relevante estudiar el efecto del inhibidor en la AHN.

Aunque existen algunos trabajos que nos dan ciertas pistas sobre el efecto de los inhibidores de la GSK-3 en la neurogénesis hipocampal adulta, ningún trabajo ha cuantificado el efecto de la inhibición selectiva de la GSK-3 en la maduración y/o supervivencia de las subpoblaciones inmaduras de la SGZ.

Para concluir evaluaremos en efecto del tratamiento en el comportamiento de tipo ansioso. Hasta donde abarca nuestro conocimiento ningún trabajo ha reportado que la evaluación de la conducta de tipo ansiosa mediante un EPM altere la AHN. Por esa razón se evaluó esta conducta en estos grupos experimentales .

3.1 Efecto del VP2.51 en la neurogénesis hipocampal adulta.

Se estudió el efecto de tratamiento con el inhibidor de la GSK-3 en la proliferación celular del giro dentado, así como la diferenciación y/o supervivencia.

3.1.1 Efecto del VP2.51 en la proliferación en el giro dentado de la formación hipocampal.

El número de células en proliferación se determinó con la BrdU, análogo de timidina. Ésta se ha utilizado clásicamente para estudiar las células recién formadas en los nichos neurogénicos. En función del tiempo que pase entre la administración y el sacrificio podemos hablar de proliferación (tiempos cortos) o además de diferenciación y supervivencia (tiempos largos). Sin embargo hay que tener en cuenta varios factores cuando utilizamos análogos. Cuando hablamos de una edad celular o que nacieron hace un tiempo determinado, nos referimos a eso exactamente, cuando nació esa célula, esto sin embargo no significa que tengan las mismas características de maduración. Cuando inyectamos los análogos, todas aquellas células que se estén dividiendo lo incorporarán. En la AHN, no sólo prolifera un tipo celular y esta proliferación está acotada a un tiempo específico, sino que hay diferentes tipos celulares (desde la célula tipo 1, hasta las células tipo 3, para más información véase la introducción 2.3.2 La zona subgranular del giro dentado) proliferando simultáneamente y con edades funcionales diferentes. Esto resulta especialmente importante cuando evaluamos células de pocos días de edad. Como publicó Kempermann, y se observa en la figura, las células por ejemplo de 3 días de edad marcadas con BrdU serían una mezcla de células Calret⁺, células tipo III y en menor medida, células tipo 2a y 2b (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Lo importante de este caso es que el porcentaje de estas subpoblaciones de células de una edad determinada puede variar en función de las circunstancias experimentales y el tratamiento farmacológico.

En nuestro caso se evaluaron células de 24h de edad, por tanto se marcaron principalmente una mezcla de células tipo 2a, 2b y tipo 3 (figura 75) y dado que todas estas células están en ciclo, podemos hablar de efectos en la proliferación.

El principal argumento en contra del uso de la BrdU radica en que, además de marcar células en proliferación, también puede marcar células en fase de reparación del DNA o en fases finales de la apoptosis. Para evitar dicho marcaje se utilizó una dosis de 50 mg/kg, que permite un marcaje claro de células en fase S y previene el

marcaje de células que sintetizan pequeñas secuencias de DNA (Llorens-Martin and Trejo 2011). Aun así es aconsejable el uso de otros marcadores que complemente y validen el resultado obtenido con la BrdU. Aunque hay varios marcadores intrínsecos de la proliferación, se eligió la pH3 por detectar únicamente células en mitosis.

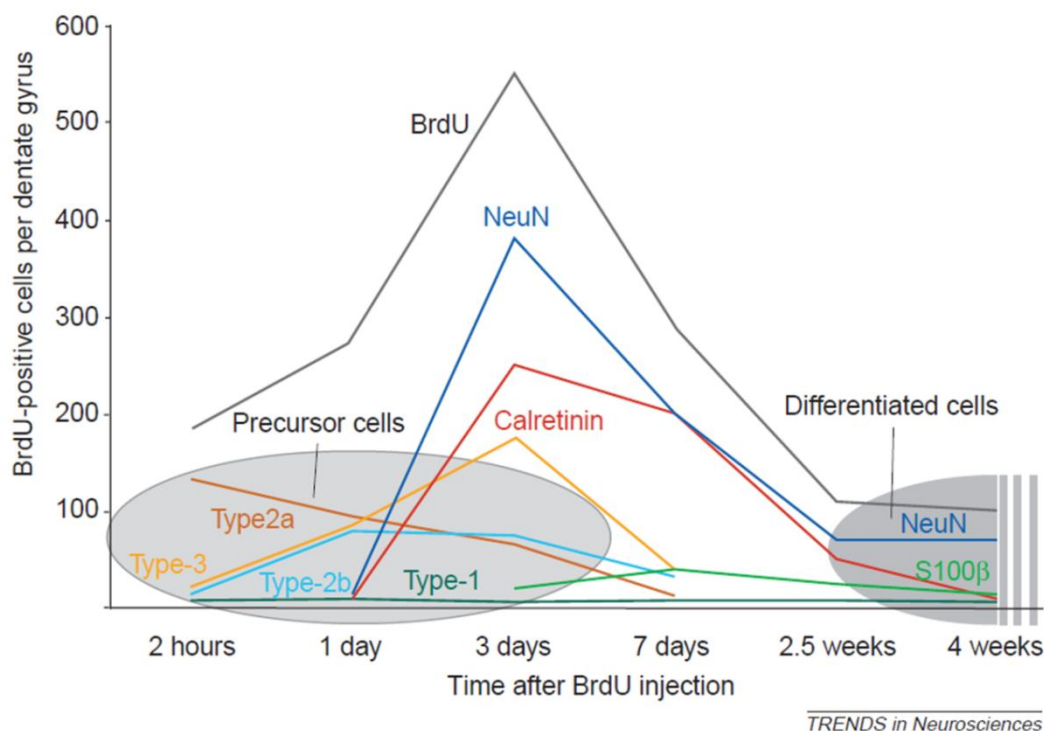


Figura 75: Evolución de número total de células marcadas con BrdU a lo largo del tiempo, así como los porcentajes de colocalización con otros marcadores (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Nótese, que si comparamos los números absolutos de los recuentos, mientras en el grupo vehículo se observa, respecto al número de células pH3⁺, el doble de células BrdU⁺ en el grupo VP2.51 observamos en torno a 4 veces más. Resulta lógico y esperable observar más células en el recuento de la BrdU que de la pH3. Esto se debe principalmente a que la señal de las pH3 está acotada a las células que se encontraban en mitosis en el momento del sacrificio. Mientras, la BrdU está disponible y activa sistémicamente durante un periodo aproximado de dos horas (Llorens-Martin and Trejo 2011), por tanto todas aquellas células que entraron durante este intervalo

temporal en fase S del ciclo celular, incorporaron el análogo. Este incremento es más evidente en el grupo VP2.51 ya que la BrdU experimenta un efecto multiplicador debido a que este no solo marcó las células en división durante la inyección, sino aquellas que siguieron dividiéndose hasta el momento del sacrificio. Nótese en la figura 75 que el número de células detectadas un día después de la administración es entorno a un 50% mayor al número de células detectadas 2h después de la administración. Además hay que tener en cuenta que el proceso de mitosis dura entre 20 min y 2h y la fase S del ciclo celular de los progenitores dura 24,5h (Cameron and McKay 2001).

Una vez matizadas las diferencias conceptuales entre los dos tipos de marcadores se discutirá el efecto del VP2.51 en la proliferación celular del GD de la formación hipocampal. Como se muestra en la figura 35, nuestros resultados indican que la capacidad proliferativa es muy sensible al efecto del VP2.51. Hemos cuantificado un incremento en el número total de células BrdU⁺ y pH3⁺ del 150% y 50% respectivamente. Estos resultados no son sorprendentes, teniendo en cuenta que, como se explicó en la introducción la vía canónica de *Wnt* regula la actividad de la GSK-3. Como se explicó en la señalización autocrina de *Wnt* regula la proliferación y multipotencialidad de los progenitores por la vía canónica (Wexler, Paucer et al. 2009).

Trabajos previos de varios grupos han investigado el efecto del Litio y del VPA, con resultados en los que observan un aumento de la proliferación (Chen, Rajkowska et al. 2000, Lenox and Wang 2003, Jin, Kovacs et al. 2005). El único trabajo que ha estudiado el efecto de un inhibidor específico de la GSK-3, el NP031112, en la proliferación del giro dentado establece un aumento significativo de la proliferación con tiempos variables de tratamiento, 7 y 14 días (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012). Sin embargo cabe destacar, que ellos observan, alrededor de 1.700 células BrdU⁺ en los animales controles y entre 3.400 y 3,750 células BrdU⁺ en los animales tratados con el inhibidor 7 y 14 días respectivamente. Las discrepancias señaladas pueden ser consecuencia del modelo experimental estudiado, mientras nosotros utilizamos ratones, ellos utilizaron ratas. Sin embargo resulta sorprendente que ellos observen

incrementos de hasta el 220%. Esto puede deberse a la distinta naturaleza del compuesto inhibidor o a la dosis utilizada.

3.1.2 Efecto del VP2.51 en la diferenciación, maduración y supervivencia de las células generadas *de novo* en el giro dentado de la formación hipocampal.

Sumado al tradicional empleo de la BrdU, para marcar y seguir las nuevas células nacidas en el giro dentado, están siendo empleados numerosos marcadores detectables por inmunohistoquímica. Estos marcadores resultan de gran utilidad a la hora de tratar de identificar distintos estadios de maduración. Sin embargo es importante tener en cuenta que las neuronas en desarrollo están en continuo cambio y por tanto estos marcadores no son marcadores del estado funcional. Dentro de una misma subpoblación encontraremos una mezcla heterogénea de diferentes estadios de diferenciación.

En la SGZ, la mayoría de las células en proliferación se diferencian a neuronas (Steiner, Kronenberg et al. 2004). Previamente se ha descrito que los inhibidores de la GSK-3 son capaces *in vitro* de promover la diferenciación neuronal (Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012). Para estudiar el efecto del fármaco en la diferenciación *in vivo* se utilizó el marcador Prox1, específico de linaje neuronal granular, colocalizado con BrdU. Como se puede observar en la Figura 36, el tratamiento incrementó un 5% el número de células que adquieren linaje neuronal frente al grupo vehículo. De nuevo la vía *Wnt* puede ser clave en este hallazgo, ya que entre otros genes regula la expresión de Prox1 (Karalay, Doberauer et al. 2011).

Para estudiar las poblaciones inmaduras hemos utilizado los marcadores doblecortina (DCX) (Gleeson, Allen et al. 1998) y calretinina (Calret) (Brandt, Jessberger et al. 2003), que están bien establecidos para el estudio de estas poblaciones (Brandt, Jessberger et al. 2003). Estas poblaciones a su vez se pueden dividir en 3 subpoblaciones diferentes, las células DCX⁺/Calret⁻, las células DCX⁺/Calret⁺ y las células DCX⁻/Calret⁺, las células identificadas con estos marcadores abarcan las neuronas inmaduras con un curso temporal que va desde las más inmaduras a las más maduras, respectivamente. Resultados del grupo, así como de otros autores han revelado que ambas poblaciones y subpoblaciones de neuronas inmaduras responden

diferencialmente a manipulaciones tales como el enriquecimiento ambiental o el ejercicio (Kronenberg, Reuter et al. 2003, Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2006, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2010, Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2010, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011, Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013).

En este trabajo hemos estudiado el efecto de un inhibidor de la GSK-3 en la maduración y supervivencia de las poblaciones y subpoblaciones inmaduras. Las poblaciones analizadas han sido el número total de células DCX^+ y $Calret^+$ del giro dentado, así como las siguientes subpoblaciones de estas células: $DCX^+/Calret^-$, $DCX^+/Calret^+$ y $DCX^-/Calret^+$. Teniendo en cuenta que el fármaco induce un incremento de la proliferación y del porcentaje de células que adquieren linaje neuronal, sería esperable que el tratamiento también incremente las subpoblaciones de neuronas inmaduras. Sin embargo hay que tener en cuenta que el sistema tiende a la homeostasis, y un incremento en la proliferación puede acarrear una disminución de la supervivencia.

Los resultados demuestran que el VP2.51 incrementa significativamente el número de células de las poblaciones DCX^+ y $Calret^+$, así como de las subpoblaciones $DCX^+/Calret^-$, $DCX^+/Calret^+$. No se observaron cambios significativos en la subpoblación $DCX^-/Calret^+$. Esto puede deberse, no tanto a una respuesta específica, sino más bien a que el número de *stacks* analizados no fueron suficientes. Recordemos que la DCX y Calret tienen un patrón de silenciamiento muy parecido (figura 9). Que sepamos, esta es la primera vez que se describe el efecto de un inhibidor específico en las subpoblaciones inmaduras. Este resultado es importante ya que las subpoblaciones inmaduras pueden tener un papel diferente de las células granulares maduras, en función de su estado de maduración y basado en sus propiedades electrofisiológicas inmaduras (Perez-Domper, Gradari et al. 2013, Gradari, Perez-Domper et al. 2014).

Estos resultados demuestran, junto con los estudios de proliferación, que el VP2.51 no sólo incrementa la proliferación, sino que este aumento va acompañado de un incremento del número de células que adquieren el linaje neuronal y un aumento de la supervivencia y/o maduración. Todo esto en conjunto nos evidencia el papel general

de la GSK-3 en la neurogénesis hipocampal adulta, y su potencial uso en patologías relacionadas con una disminución de la tasa neurogénica.

3.2 Efecto del VP2.51 en el comportamiento relacionado con la ansiedad.

Parece existir una relación entre la neurogénesis hipocampal adulta y las conductas relacionadas con la ansiedad (Revest, Dupret et al. 2009, Kheirbek, Klemenhagen et al. 2012). Además se ha demostrado que la eliminación del residuo de inhibición, Ser21/9 de la GSK-3 α y GSK-3 β respectivamente, en un ratón genéticamente modificado resulta en una conducta de tipo ansiosa (Polter, Beurel et al. 2010). Por esta razón nos planteamos estudiar el efecto del VP2.51 en un laberinto en cruz elevado (EPM). Como se observa en la figura 38 el fármaco no indujo un efecto ansiolítico en los animales tratados. Estos resultados pueden deberse a que, en primer lugar el fármaco sólo tenga un efecto ansiolítico en animales ansiosos o que sea necesario una dosis mayor o un tratamiento más largo.

4. Estudios *in vivo* del VP2.51. Efecto crónico del fármaco sobre conductas relacionadas con la función hipocampal.

Como se explicó en la introducción, se ha relacionado la formación hipocampal y la AHN con las tareas de aprendizaje (Scoville and Milner 1957, Zola-Morgan, Squire et al. 1994, Vargha-Khadem, Gadian et al. 1997, Abrous, Koehl et al. 2005, Leuner, Gould et al. 2006, Deng, Aimone et al. 2010) y en el mantenimiento del estado de ánimo (Zhao, Deng et al. 2008, Lucassen, Pruessner et al. 2014). Diversas evidencias experimentales indican que las alteraciones psiquiátricas, incluyendo la depresión, están relacionadas con la AHN (Tanti and Belzung 2013).

4.1 Efecto del VP2.51 en el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo.

La discusión de este apartado se realizará junto a la discusión de los efectos del VP2.51 en la memoria, para intentar dar una visión más completa y coherente (véase

7.2 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la memoria a corto plazo, la memoria a largo plazo y la reactivación de la memoria).

4.1 Efecto del VP2.51 en la desesperanza aprendida, ¿es un antidepresivo potencial?

La prueba del nado forzado es la prueba mejor caracterizada y más ampliamente utilizada para evaluar el efecto antidepresivo de los fármacos (Castagne, Moser et al. 2009). Nuestros resultados muestran que el fármaco reduce el tiempo de inmovilidad y por tanto podría ser un buen candidato como fármaco antidepresivo. Estudios previos con inhibidores de la GSK-3 también han demostrado reducir el tiempo de inmovilidad en el FST (Gould, Einat et al. 2004, Kaidanovich-Beilin, Milman et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008, Du, Wei et al. 2010). Para validar nuestros resultados obtenidos en un FST es necesario comprobar que la actividad motora no está alterada. Como se demostró en el capítulo “Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados crónicamente con el inhibidor VP2.51” la actividad normal de los ratones no está alterada por el tratamiento farmacológico. Estos resultados en conjunto demuestran una vez más, que la GSK-3 es una diana farmacológica potencial en el tratamiento de la depresión.

Aunque existe cierta polémica al respecto, varios autores creen que es necesario un efecto proneurogénico para que los antidepresivos puedan ejercer su función (Santarelli, Saxe et al. 2003, Petrik, Lagace et al. 2012, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013). Además está ampliamente validado que los fármacos antidepresivos son proneurogénicos (Malberg, Eisch et al. 2000, Manev, Uz et al. 2001, Santarelli, Saxe et al. 2003, Kodama, Fujioka et al. 2004, Encinas, Vaahtokari et al. 2006, Huang and Herbert 2006, Marcussen, Flagstad et al. 2008). Sin embargo no existe, que nosotros sepamos, ninguna publicación que relacione el efecto antidepresivo observado en los inhibidores de la GSK-3 con un efecto proneurogénico.

En este estudio (figura 39) hemos comprobado que el fármaco es capaz de aumentar la proliferación y/o supervivencia de las células, marcadas con BrdU, nacidas 24h antes del FST y 48h antes del sacrificio. Sin embargo en el estudio de las

poblaciones inmaduras, el fármaco no ha mostrado diferencias significativas con los animales del grupo vehículo.

Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que la evaluación histológica se ha realizado en animales sometidos a un FST. El FST por su condición genera una situación altamente estresante para los ratones acompañada de una liberación de corticosterona (Connor, Kelly et al. 1997). Mientras la mayoría de los autores coinciden en que el efecto del estrés crónico induce una reducción de la AHN (Tanti and Belzung 2013), mucho menos se sabe del efecto del estrés agudo (Heine, Maslam et al. 2004, Brummelte and Galea 2010, Llorens-Martin and Trejo 2011).

Nuestros resultados de proliferación han indicado que el fármaco tras un estrés agudo ha mantenido su efecto proneurogénico en las células BrdU⁺ de 48h de edad, y ésto está en concordancia con numerosos estudios que no han visto que la proliferación esté drásticamente modificada por un estrés agudo (Heine, Maslam et al. 2004, Thomas, Urban et al. 2006, Thomas, Hotsenpiller et al. 2007, Llorens-Martin and Trejo 2011). Sin embargo no ha ocurrido lo mismo con las poblaciones de neuronas inmaduras del grupo VP2.51 que han sufrido una disminución de la supervivencia. Un trabajo previo ha descrito que el FST altera preferentemente la supervivencia de las neuronas de una semana de edad (Llorens-Martin and Trejo 2011). Este trabajo está realizado en animales controles sometidos y no sometidos a un FST. Nuestro diseño experimental expone a ambos grupos a un FST, y testamos el efecto del VP2.51 en la supervivencia de las poblaciones inmaduras. Nosotros hipotetizamos que aunque el fármaco sea proneurogénico y aumente en condiciones normales las poblaciones inmaduras, en una situación de estrés, estas neuronas inmaduras pueden ser más sensibles a mecanismos de muerte inducidos por el FST y contrarrestar los efectos proneurogénicos observados previamente. Todo sistema tiende a la homeostasis, de manera que resulta lógico pensar que los incrementos inducidos por fármacos puedan conferir a las células una diferente sensibilidad a la muerte, para en un momento dado ejercer su potencial terapéutico y volver al equilibrio. Dicho con otras palabras, aunque el fármaco aumentó la supervivencia de células, lo que generó esa “protección” en el FST, este mismo protocolo indujo su muerte selectiva y por esa razón no vemos diferencias en el número de células entre el grupo vehículo y VP2.51.

Para concluir esta sección, se trató de analizar si la respuesta en el FST correlacionaba con alguna de las poblaciones estudiada. Además nos interesó ver si el fármaco generaba alguna respuesta específica basándonos en las variabilidades intergrupales. No se observó ninguna correlación significativa. Este resultado nos imposibilita asignar a una población concreta el resultado del FST. Esto puede deberse a que los marcadores, aunque acotan subpoblaciones, cada subpoblación contiene tipos celulares en diferentes estadios de diferenciación. Para asignar una función específica sería necesario realizar un estudio más exhaustivo con análogos de timidina.

5. Estudios *in vivo* del VP2.51. Efecto terapéutico.

Resultó especialmente interesante evaluar el efecto del fármaco en animales previamente estresados y/o depresivos con un FST. Aunque se ha estudiado el efecto de los inhibidores de la GSK-3 en un modelo de UCMS (Silva, Mesquita et al. 2008, Ma, Dang et al. 2013), actualmente no existe, hasta donde nosotros sabemos ningún trabajo que evalúe el efecto terapéutico de los inhibidores de la GSK-3 en modelos animales previamente depresivos y/o estresados. Este paradigma resulta de especial relevancia, ya que aunque no es un modelo de MDD, sí induce un comportamiento de tipo ansioso o depresivo. Además este protocolo del FST modificado tuvo varias ventajas en contraste con el UCMS: es fácil de realizar, no se necesita una gran cantidad de espacio y lo más importante de todo, es fácilmente reproducible.

En este capítulo se evaluó si el efecto proneurogénico y antidepresivo del fármaco afectaba a la recuperación de animales previamente estresados y/o depresivos y si existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas.

5.1 Efecto del VP2.51 en la recuperación de la conducta relacionada con ansiedad/depresión.

Como se explicó en los resultados, nos propusimos estudiar si el estrés y/o la desesperanza aprendida generados durante una exposición a un FST modificado, se podría revertir con el tratamiento con el inhibidor de la GSK-3, VP2.51 Se evaluó la conducta de tipo depresivo con una prueba de suspensión por la cola (TST). Los

resultados mostraron que el VP2.51 es capaz de inducir una recuperación en animales estresados y/o depresivos tratados durante tres semanas y una dosis de 2,5 mg/kg.

Sin embargo, lo que resultó especialmente interesante fue estudiar cómo los cambios en la AHN, podían estar influenciando dicha respuesta comportamental. Dado que previamente describimos que los efectos proneurogénicos del fármaco se veían alterados por el protocolo de FST antes del sacrificio, decidimos no evaluar la histología en los animales sometidos al TST. En su lugar llevamos 2 grupos experimentales en paralelo, que se sometieron al FST modificado y en lugar de hacer un TST antes del sacrificio, se realizó un EPM, que no altera la AHN. Esto nos permitió ver el efecto del fármaco en las subpoblaciones y como podía estar ejerciendo su mecanismo terapéutico antidepresivo y ansiolítico.

5.2 Efecto del VP2.51 en la conducta relacionada con la ansiedad.

No es infrecuente, que un fármaco que no induce cambios en condiciones normales, si muestre un efecto terapéutico en condiciones patológicas. Como ya hemos mencionado en repetidas ocasiones, el FST modificado genera un comportamiento de tipo depresivo y/o ansioso. En este contexto evaluamos el efecto del fármaco en la conducta relacionada con la ansiedad.

Los resultados indicaron que el tratamiento no alteró, ni el tiempo en los brazos abiertos, ni el tiempo en los brazos cerrados. Sin embargo sí se observó en el grupo VP2.51 un tiempo significativamente mayor en el centro del EPM. La región central resulta especialmente compleja de evaluar, ya que introduce ambigüedad en las cuantificaciones de entradas y tiempo en los brazos e incrementa la variabilidad de los datos. Clásicamente los fármacos ansiolíticos aumentan el tiempo y/o el número de entradas en los brazos abiertos. Por tanto los resultados no parecen indicar un efecto ansiolítico del tratamiento en animales previamente estresados y/o depresivos. Sin embargo, sería interesante evaluar el efecto del fármaco en la prueba del laberinto en forma de cero (zero maze), ya que este resuelve el problema de la región central con su estructura circular (Bailey and Crawley 2009).

5.3 Efecto del VP2.51 sobre la neurogénesis hipocampal adulta, ¿Existe una respuesta específica de las diferentes subpoblaciones neurogénicas?

La AHN es una forma de neuroplasticidad y la modulación de ésta puede conferir al sistema un beneficio ante una situación determinada. Creemos que el efecto proneurogénico y terapéutico del fármaco tienen una vía común de actuación. Es importante mencionar que los fármacos antidepresivos son proneurogénicos y que existen varios trabajos que destacan la necesidad de una AHN intacta para que estos puedan ejercer su mecanismo de actuación (Santarelli, Saxe et al. 2003, Surget, Saxe et al. 2008, Surget, Tanti et al. 2011, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013).

Se evaluó la proliferación con el marcador de células en división pH3, las poblaciones inmaduras y el efecto en la proliferación y supervivencia de las células generadas 24 horas antes y 48 horas después del FST modificado, marcadas con CldU e IdU respectivamente.

El uso de los análogos de timidina CldU e IdU, otorga al experimentador la posibilidad de estudiar en un mismo animal dos fechas de nacimiento diferentes. Esto proporciona una herramienta de gran utilidad en los estudios de la AHN, sin embargo muchos trabajos se limitan al uso de la BrdU, que acota el diseño al estudio de una única fecha de nacimiento. La CldU e IdU nos posibilitan testar hipótesis más complejas donde se estudian dos edades de nacimiento concretas de interés, sin necesitar duplicar los grupos experimentales y permitiéndonos evaluar en un mismo animal la relación entre las células nacidas en dos momentos distintos. Nuestro laboratorio ha sido pionero en la puesta a punto de la técnica, en el campo de la AHN, así como ha publicado varios trabajos con dicho marcaje (Llorens-Martin, Tejeda et al. 2010, Llorens-Martin, Tejeda et al. 2011, Llorens-Martin and Trejo 2011, Llorens-Martin and Trejo 2011).

Los resultados del número total de pH3 indican que el fármaco indujo un incremento en la proliferación. En cuanto a las poblaciones y subpoblaciones inmaduras, no se observaron cambios en la subpoblación DCX⁺/Calret⁺, la más joven de todas, así como en la población DCX⁺. Sin embargo sí se vio un efecto proneurogénico en la subpoblación DCX⁺/Calret⁺ y en la población Calret⁺. El número de células CldU e

IdU indicaron en primer lugar que el FST modificado disminuyó significativamente la supervivencia de las células nacidas 24 horas antes del FST modificado y en segundo lugar que el tratamiento no mejoró la supervivencia ni de las células nacidas 24 horas antes ni 48 horas después de FST modificado.

Sin embargo lo realmente interesante en analizar los resultados de forma conjunta, para obtener una visión más completa de lo que está ocurriendo en nuestro paradigma experimental. En primer lugar se analizará la relación entre las células CldU e IdU positivas, así como su relación con las poblaciones inmaduras. Del mismo modo se analizarán las relaciones entre las diferentes subpoblaciones inmaduras y los datos de proliferación.

A tenor de los resultados, se ha observado que el FST induce una disminución de la supervivencia de las células generadas 24 horas antes del FST modificado. Esto lo podemos determinar, comparando con el número de células IdU positivas. Esta comparación es posible porque está descrito que el número y por tanto la supervivencia de las células de a partir de 2,5 semanas de edad, se mantiene estable hasta al menos un año después (Kempermann, Kuhn et al. 1997, Kempermann, Jessberger et al. 2004). De manera que resulta posible comparar el número total de células CldU e IdU y concluir que el descenso en la supervivencia de las células CldU se deben al protocolo experimental del FST.

Cuando evaluamos conjuntamente los análogos de timidina y las poblaciones inmaduras y lo englobamos en el marco neurogénico hay que tener en cuenta que aunque sería lógico pensar las células IdU⁺, fuesen a su vez DCX⁺/Calret⁺ (el marcador de la DCX y la Calret se expresan hasta prácticamente las 4 semanas de edad), esto no es así. Este hecho se podría explicar fácilmente mencionando que los marcadores histológicos no son marcadores funcionales. Dentro de la población DCX⁺/Calret⁺ hay una variedad de estadios de diferenciación diferentes con funciones posiblemente distintas. Sin embargo la respuesta es mucho más simple. Como se explicó previamente, los análogos de timidina se incorporan a las células en división, que en la AHN comprenden las células de tipo 1, 2 y 3. Como se ve en la figura 75, las células marcadas con BrdU 2,5 semanas antes del sacrificio son prácticamente todas células

diferenciadas, apagándose completamente dicho marcador a la edad de 4 semanas. Por tanto podemos afirmar que nuestras células, tanto CldU, como IdU son neuronas maduras en el momento del sacrificio, y que el FST disminuyó la supervivencia de las neuronas maduras CldU⁺.

La ausencia de efectos del fármaco creemos que se debe a la pauta de administración, ya que el fármaco se comenzó a inyectar el primer día del FST. Los resultados demuestran que 1-2 días de tratamiento no son suficientes para proteger de la muerte a las células CldU y que 4 días de tratamiento no son suficientes para incrementar la proliferación y/o supervivencia de las células IdU⁺.

Está descrito que la exposición a un FST disminuye la supervivencia de las células de 1 semana de edad (Llorens-Martin and Trejo 2011) y que la proliferación se normaliza a las 24 horas del estrés agudo (Heine, Maslam et al. 2004). Sin embargo, que nosotros sepamos, se desconoce el efecto de un estrés agudo en el balance de la tasa neurogénica y sus efectos a medio-largo plazo en animales adultos. A nosotros nos resultaría esperable que el sistema tendiese a autorregularse para volver a la normalidad e incrementase la proliferación de las generaciones de células siguientes, sin embargo desconocemos si es capaz de hacerlo eficientemente. Recordemos que conductualmente estos animales presentan una conducta de tipo ansiosa y/o deprimida. Aunque estas cuestiones no están enmarcadas en el trabajo de esta tesis doctoral podemos hacer una aproximación comparando los números absolutos de las poblaciones inmaduras de este capítulo con los resultados obtenidos en el segundo capítulo de la tesis. Recordándolo brevemente, se analizó el efecto del fármaco en animales controles y se observó un efecto proneurogénico en todas las subpoblaciones inmaduras (figura 37). Si comparamos los números totales, se puede observar, que parece que el FST ha inducido una activación neurogénica, posiblemente para contrarrestar los efectos deletéreos en las poblaciones neuronales nacidas antes del FST y sensibles a este estrés. Sin embargo cabe remarcar que aunque estos experimentos no sean realmente comparables, ya que se han realizado a tiempos diferentes y no se han realizado en las mismas condiciones experimentales, nos dan una pista sobre lo que puede estar ocurriendo en el sistema. Para reforzar esta hipótesis, está descrito que la deprivación materna en P3 durante un periodo de 24

horas y sacrificando en P21 induce un efecto proneurogénico en los ratones macho analizados (Oomen, Girardi et al. 2009). Sin embargo resulta destacable, que este incremento inicial o transitorio, a largo plazo genera deficiencias neurogénicas y existen ciertas discrepancias respecto a los efectos comportamentales (Oomen, Soeters et al. 2010, Suri, Veenit et al. 2013). Aunque este modelo experimental diste del nuestro, consideramos que los mecanismos regulatorios están conservados.

Por tanto, en este contexto proneurogénico inducido por el FST, como respuesta a la muerte de las células de una semana de edad, se suma el efecto del VP2.51, que es capaz de incrementar significativamente la población Calret^+ y la subpoblación $\text{DCX}^+/\text{Calret}^+$ respecto al grupo vehículo. Si analizamos el incremento generado por el VP2.51, se puede observar que es menor al descrito en condiciones normales. Esto creemos que ocurre porque la respuesta del sistema de la AHN a los diferentes estímulos proneurogénicos hace techo. En estas condiciones los efectos de los fármacos proneurogénicos pueden verse silenciados.

Como el sistema continuamente se regula y responde de forma plástica a diferentes señales, tanto del mundo externo, como del propio sistema neurogénico, de nuevo resultaría esperable que este incremento transitorio tendiese a la homeostasis, disminuyendo la capacidad proliferativa y/o supervivencia de las próximas generaciones de células. Esto es lo que pensamos que está ocurriendo en las células DCX^+ y $\text{DCX}^+/\text{Calret}^-$. Prestando especial atención a la subpoblación $\text{DCX}^+/\text{Calret}^-$, la subpoblación más joven, resulta sorprendente, que la supervivencia de esta subpoblación que incluye las células tipo 3 y que aún no han salido de ciclo no se vea alterada por el tratamiento farmacológico, cuando los resultados de proliferación con pH3 indican un efecto proneurogénico del VP2.51. Creemos que esto puede deberse a que el fármaco ha ejercido efectos específicos en diferentes estadios de maduración, no tanto por su estadio funcional si no en un contexto neurogénico cambiante y que busca llegar a una homeostasis tras un FST modificado.

En este complejo escenario regulatorio neurogénico, nuestro fármaco ha ejercido un efecto terapéutico en los animales tratados. Varios autores han llamado la atención

sobre la heterogeneidad funcional hipocampal y su relación con el efecto antidepressivo de diversos fármacos (Tanti and Belzung 2013).

Como se explicó en la introducción, el hipocampo es una región cerebral heterogénea y se ha descrito consistentemente una disociación funcional a lo largo de este eje septo-temporal (figura 11). En roedores la región ventral parece estar preferentemente relacionada con conductas relacionadas con la ansiedad (Kjelstrup, Tuvnes et al. 2002, Degroot and Treit 2004, McHugh, Deacon et al. 2004, Trivedi and Coover 2004, Pentkowski, Blanchard et al. 2006, Hunsaker and Kesner 2008).

Como ya hemos dicho anteriormente, el comportamiento depresivo y la MDD están muy relacionados con el estrés y varios autores han descrito alteraciones de la en la región ventral de animales con un comportamiento depresivo y/o MDD (Jayatissa, Bisgaard et al. 2006, Brummelte and Galea 2010, Elizalde, Garcia-Garcia et al. 2010, Oomen, Soeters et al. 2010, Morley-Fletcher, Mairesse et al. 2011, Hawley and Leasure 2012, Tanti, Rainer et al. 2012, Diniz, dos Santos et al. 2013, Tanti, Westphal et al. 2013).

En este contexto, resultó especialmente interesante investigar si nuestro fármaco, el VP2.51 inducía efectos regionales específicos. Los resultados mostraron que el fármaco incrementó la proliferación significativamente en la región ventral de los animales tratados con VP2.51. Acorde a estos resultados, está el único trabajo realizado con un inhibidor de la GSK-3, utilizando el litio en un modelo de comportamiento de tipo depresivo inducido por estrés crónico de restricción. Este trabajo determinó un aumento de la proliferación específico de la región ventral (O'Leary, O'Connor et al. 2012). Sin embargo estudios realizados con inhibidores de la recaptación de serotonina han mostrado mayoritariamente incrementar la proliferación en ambas regiones (Jayatissa, Bisgaard et al. 2006, Elizalde, Garcia-Garcia et al. 2010, Nollet, Gaillard et al. 2012, Rainer, Nguyen et al. 2012). No obstante, el trabajo de Tanti *et al*, ha descrito un efecto específico en la región ventral en ratones tratados con fluoxetina tras un protocolo de UCMS (Tanti, Rainer et al. 2012). Creemos que las discrepancias pueden deberse a los límites que han determinado para acotar la región dorsal y ventral.

Creemos que el hallazgo del efecto específico en la región ventral le confiere al fármaco ciertas ventajas. Mientras otros fármacos actúan de manera inespecífica en todo el hipocampo, el VP2.51 parece estar ejerciendo su efecto en aquellas regiones alteradas por el comportamiento de tipo depresivo.

6. Efecto del VP2.51 en un modelo de depresión mayor. Comparativa con la fluoxetina.

Con el fin de hacer un estudio lo más completo posible del efecto antidepresivo del fármaco, se utilizó el UCMS como modelo de MDD. La finalidad de este experimento era, una vez descrito el efecto antidepresivo potencial y la mejora en la conducta de tipo depresiva y/o ansiosa, determinar el efecto curativo del fármaco en un modelo de MDD y compararlo con la fluoxetina, un antidepresivo comercial.

Se utilizó la fluoxetina por varias razones. El uso de un fármaco comercial nos permite comparar la eficiencia de nuestro fármaco, además nos ha servido como control positivo del efecto de un fármaco antidepresivo en nuestro modelo experimental. Sin embargo lo realmente importante son las razones por las que hemos optado elegir la fluoxetina frente a otros fármacos comerciales. Éstas han sido que la mayoría de publicaciones que utilizan nuestro modelo experimental de MDD utiliza la fluoxetina y por tanto nos pareció conveniente su uso. Además está descrito que la fluoxetina inhibe la GSK-3 (Li, Zhu et al. 2004, Li, Rosborough et al. 2007, Beaulieu, Zhang et al. 2008). Es más, el bloqueo de la inhibición de la GSK-3 con un modelo murino genéticamente modificado impide los efectos proneurogénicos de la fluoxetina (Eom and Joep 2009).

En primer lugar discutiremos los resultados de los parámetros utilizados para evaluar el efecto del UCMS, a continuación se discutirá el efecto antidepresivo del VP2.51 y la fluoxetina, seguidamente se discutirán los efectos del UCMS y tratamiento

en el volumen de la formación hipocampal, capa granular del GD y área SGZ. Para concluir se discutirán los resultados histológicos.

6. 1 Parámetros críticos para evaluar la eficiencia del protocolo UCMS y del tratamiento farmacológico.

Aunque la mayoría de trabajos que utilizan el UCMS como modelo de MDD utilizan la prueba de preferencia a la sacarosa como indicador de la eficiencia del protocolo y el tratamiento farmacológico, nosotros no pudimos realizarlo por problemas técnicos. Sin embargo esto no pareció un impedimento ya que según Nollet *et al* (Curr. Prot. Pharm.) el peso, el estado del pelaje y la anidación son parámetros críticos y válidos para monitorizar la eficiencia de nuestro paradigma experimental del UCMS y del tratamiento farmacológico (Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Es más, este protocolo no sugiere la realización de la prueba de preferencia a la sacarosa.

En relación con el seguimiento del peso, nuestros resultados mostraron una pérdida significativa del peso en la primera semana. A continuación hubo una recuperación del peso, esto lo atribuimos a que los animales se familiarizaron con esta nueva situación de estrés. Como se explicó en las consideraciones técnicas, el principal problema del UCMS es que resulta muy poco reproducible. Esto se debe a que en los artículos no se detalla con claridad el protocolo realizado por su complejidad y larga duración temporal, no existiendo un convenio en el número de estreses diarios, tipo de estreses y pauta de ejecución. Sin embargo, como se explicó anteriormente para que un estrés genere una respuesta estresante fisiológicamente hablando es necesario carecer de respuesta anticipada o de una recuperación rápida, es decir, que sea impredecible e incontrolable (Koolhaas, Bartolomucci et al. 2011). Nosotros tras una semana de protocolo consideramos que los animales se “habituaron” a esta nueva situación y por eso consideramos necesario incrementar la intensidad y la frecuencia. Esto resultó en una nueva pérdida de peso durante la siguiente semana, sin llegar a ser estadísticamente significativa. Una semana después ya resultó la pérdida de peso estadísticamente significativa respecto al grupo control.

Si bien numerosos autores han descrito una disminución de la ganancia de peso durante el protocolo del UCMS (Bielajew, Konkle et al. 2002, Silva, Mesquita et al.

2008, Schweizer, Henniger et al. 2009, Surget, Wang et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2011, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013, Nollet, Le Guisquet et al. 2013), otros sin embargo no han detectado diferencias entre el peso corporal de los animales CTR y UCMS (Willner, Moreau et al. 1996, Ibarguen-Vargas, Surget et al. 2008, Surget, Saxe et al. 2008). Estas discrepancias creemos que se deben principalmente a la intensidad y frecuencia de los estreses de los diferentes trabajos.

El tratamiento farmacológico no sólo no recuperó el peso hasta valores normales, si no que no lo alteró respecto al grupo vehículo. Trabajos de diversos autores también han resultado ser resultados contradictorios respecto al efecto del tratamiento con antidepresivos. Mientras algunos autores han observado una recuperación del peso perdido hasta valores normales con un tratamiento crónico (Surget, Wang et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2011, Nollet, Le Guisquet et al. 2013), otros autores no han observado que el tratamiento farmacológico haya sido capaz de revertir esa pérdida de peso (Ibarguen-Vargas, Surget et al. 2008, Silva, Mesquita et al. 2008). Estas discrepancias creemos que se deben a la duración de administración del tratamiento antidepresivo. Creemos que si nuestro tratamiento se hubiera realizado durante un tiempo más largo, se hubiera observado un efecto en la pérdida de peso.

El estado del pelaje resulta especialmente interesante por su fácil evaluación y monitorización a lo largo del tiempo. Se considera que el deterioro del estado del pelaje puede deberse a una disminución del acicalamiento por una alteración de su conducta normal. Nosotros no observamos alteraciones en el pelaje a lo largo del protocolo de UCMS. Se ha descrito un deterioro del pelaje tras un protocolo de UCMS en las cepas BALB/c, FVB/NJ, A/J, C3H, CBA y la DBA (Mineur, Prasol et al. 2003, Mineur, Belzung et al. 2006, Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Curiosamente en la cepa C57BL/6 se han descrito dos efectos opuestos, mientras Ibarguen-Vargas *et al* ha descrito que el UCMS deteriora el estado del pelaje significativamente y que el tratamiento con el antidepresivo imipramina no es capaz de revertirlo (figura 76), Mineur *et al* publicó en 2003 que el UCMS mejoró significativamente el estado del pelaje y en 2006 publicó un trabajo donde describió deterioro (Mineur, Prasol et al. 2003, Mineur, Belzung et al. 2006, Ibarguen-Vargas, Surget et al. 2008). Aunque nosotros no hemos visto ni una mejora ni una alteración, nuestros resultados solo

contradicen el trabajo de 2006 de Mineur et al ya que el efecto del deterioro en el pelaje descrito por Ibarguen-Vargas *et al* comienza a ser significativo a partir de la séptima semana de UCMS. Nuestros resultados concluyen que en la cepa C57BL/6 el protocolo del UCMS durante un periodo de 6 semanas no induce un deterioro del estado del pelaje y que el tratamiento antidepresivo no tiene efecto en el estado del pelaje. Por tanto consideramos que las discrepancias observadas en los efectos inducidos por el UCMS en el pelaje de la cepa C57BL/6 indican que este parámetro no resulta de utilidad para evaluar el efecto del UCMS y la eficiencia del tratamiento farmacológico.

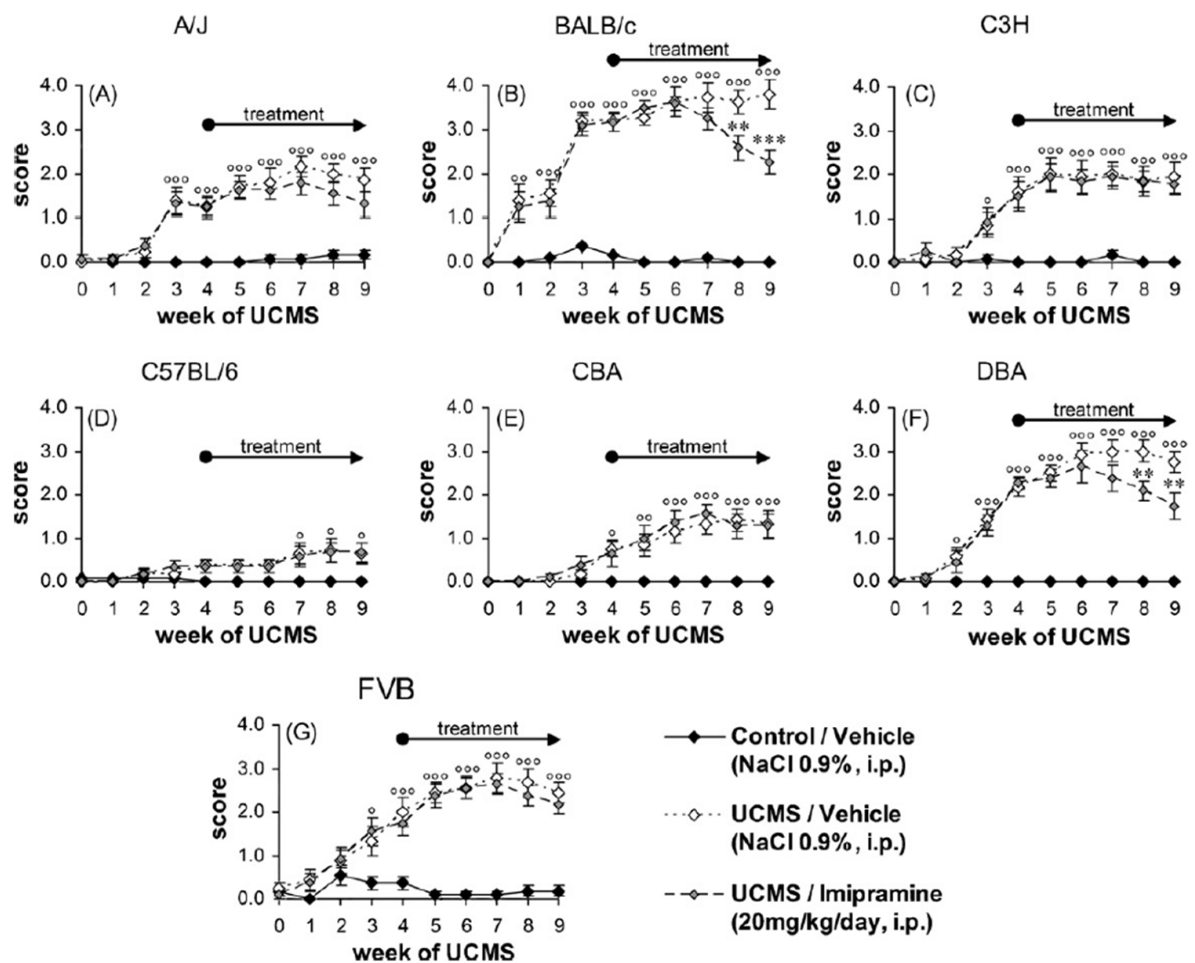


Figura 76: Efecto del UCMS y el tratamiento con imipramina en el pelaje de diferentes cepas de ratones. (Ibarguen-Vargas, Surget et al. 2008)

Para los roedores, el anidamiento es importante para la conservación de la temperatura corporal. El anidamiento es fácilmente medible con cuadrados de algodón altamente empaquetados. Los roedores, inicialmente lo desmenuzan, y

posteriormente hacen su nido. De acuerdo con el Nollet *et al* (Curr. Prot. Pharm.) (Nollet, Le Guisquet et al. 2013), el UCMS debería disminuir significativamente su capacidad de anidamiento, sin embargo nosotros no observamos que el protocolo alterase el anidamiento en ninguna de las condiciones experimentales. Que nosotros sepamos, además de Nollet *et al*, nadie ha evaluado el efecto del UCMS en la capacidad de anidamiento, por tanto nos resulta complejo discutir nuestros resultados (Nollet, Le Guisquet et al. 2013). Sin embargo una posible explicación para la divergencia en los efectos de UCMS es la cepa utilizada. Mientras Nollet *et al* utiliza la cepa BALB/c nosotros utilizamos la cepa C57BL/6.

Aunque la pérdida de peso nos indicaba que el protocolo estaba induciendo un efecto en los animales UCMS, nos pareció importante cerciorarnos que nuestros animales tenían una conducta de tipo depresivo antes de comenzar el tratamiento farmacológico. Como se dijo anteriormente, la mayoría de trabajos realizan una prueba de preferencia a la sacarosa, que evalúa la anhedonia en los animales. Cambios significativos en la preferencia a la sacarosa se consideran determinantes para comenzar el tratamiento farmacológico. Generalmente de 2 a 4 semanas de UCMS se consideran suficientes para generar un estado depresivo y comenzar el tratamiento farmacológico (Ibarguen-Vargas, Surget et al. 2008, Surget, Saxe et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2012, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013, Nollet, Le Guisquet et al. 2013, Zhang, Song et al. 2013).

Las pruebas comportamentales para determinar la conducta de tipo depresivo son el FST y el TST. Estas pruebas son muy eficientes, sin embargo generan un estrés muy fuerte para el animal que las realiza. Previamente hemos visto y discutido los efectos de un FST en la conducta de tipo depresivo y/o ansiosa de los ratones. La prueba de TST conceptualmente es idéntica a la prueba FST, por tanto podemos asumir que los efectos que genere el TST sean similares a los de un FST. Dado que era necesario realizar la prueba a todos los animales, incluido el grupo control, consideramos inadecuado el uso de estas pruebas durante el protocolo del UCMS.

Existen otras pruebas como el NSF (del inglés Novelty Suppressed Feeding) o el EPM, que evalúan conductas relacionadas con la ansiedad. Nuestro protocolo es un

modelo de MDD basado en el estrés, por eso consideramos que estas pruebas nos podrían determinar el estado ansioso de los animales. Decidimos realizar un EPM, ya que en el protocolo de la prueba del NSF se priva a los animales de comida durante 12-24 horas. Nosotros utilizamos la privación de comida como un estrés en el grupo UCMS, por tanto consideramos inadecuado su uso, sobre todo si consideramos que el EPM es igual de válido y no genera ese estrés.

Los resultados mostraron que el UCMS, en contra de lo esperado, ejercía aparentemente un efecto “ansiolítico” en los animales. Aunque inicialmente estos resultados nos sorprendieron, hay que matizarlos. En primer lugar hay que tener en cuenta la N de cada grupo experimental, mientras el grupo control tiene una N de 10 animales, el grupo UCMS tiene una N de 30 animales. Estadísticamente una N grande disminuye el error. Si agrupamos los animales en los futuros grupos experimentales vehículo, VP2.51 y fluoxetina (cuando se realizó este test aún no habían comenzado el tratamiento farmacológico), al disminuir la N se incrementa el error y en el análisis estadístico no se obtienen resultados significativos ($p=0,116$). Por rigurosidad científica consideramos que es apropiado dividir los grupos en controles y UCMS, ya que en el momento de la prueba el grupo UCMS era un único grupo experimental. Es más, con el fin de general los grupos experimentales vehículo, VP2.51 y fluoxetina lo más homogéneos posibles se tuvieron en cuenta los pesos y los datos del EPM.

A pesar de esta disertación sobre el significado estadístico de los resultados y una vez determinado que consideramos correcto dividir los animales en controles y UCMS vamos a proceder a discutir el aparente efecto “ansiolítico” del UCMS.

Aunque bastantes trabajos han evaluado el efecto del UCMS en la prueba del EPM los resultados son discrepantes. Mientras algunos autores han descrito que el UCMS genera un comportamiento de tipo ansioso en un EPM (Mineur, Belzung et al. 2006, Nollet, Gaillard et al. 2012, Darwish, Maklad et al. 2013), otros autores han observado justo lo contrario, que el UCMS induce un efecto ansiolítico (D'Aquila, Brain et al. 1994) y finalmente otros autores no han visto efecto (Li, Zheng et al. 2010, Karson, Demirtas et al. 2013). A favor de nuestros resultados, donde vemos un efecto “ansiolítico” del UCMS, está el trabajo de Schweitzer *et al* que realiza un trabajo muy completo con

diferentes pruebas comportamentales que avalan el “anómalo efecto ansiolítico” que genera el UCMS (Schweizer, Henniger et al. 2009). Nosotros pensamos, que aunque observamos lo que clásicamente se definiría como un efecto ansiolítico inducido por el protocolo, esto realmente no es así. Hipotetizamos que lo que realmente ocurre es que el grupo control y UCMS parten de situaciones basales diferentes. Mientras para el grupo control la prueba del EPM significa exponerse a un ambiente nuevo y decidir entre explorar un ambiente nuevo y exponerse a los brazos abiertos o quedarse protegido en los brazos cerrados, el grupo UCMS está “acostumbrado” a continuos estreses de mayor intensidad que el estrés generado por salir a los brazos abiertos. Esto en términos prácticos se traduce en que mientras el animal control tenderá a quedarse en los brazos cerrados por miedo a exponerse a un campo abierto, el grupo UCMS deambulará por todo EPM sin importarle tanto si es un brazo abierto o cerrado inicialmente. A favor de esta hipótesis están dos trabajos que han descrito que la reducción de serotonina suprime la respuesta adaptativa al miedo y por ello los animales pasan más tiempo en los brazos abiertos del EPM (Kusserow, Davies et al. 2004, Aldridge, Levin et al. 2005).

Se ha descrito que 4 semanas después de cesar el protocolo del UCMS los animales se “recuperan” y no muestran diferencias significativas en la conducta relacionada con la ansiedad evaluada con la prueba del EPM (Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013).

6. 2 Estudio del efecto antidepresivo del VP2.51 y la fluoxetina en un modelo de MDD.

Para evaluar el efecto de UCMS en la conducta depresiva y la eficiencia antidepresiva de los fármacos se realizó un FST. Los resultados de esta prueba indicaron que el protocolo de UCMS generó una conducta de tipo depresivo, aumentando significativamente el tiempo de inmovilidad de los animales vehículo. La fluoxetina ejerció su efecto antidepresivo y disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad respecto al grupo y el VP2.51 no mostró diferencias significativas con el grupo control o con el grupo vehículo, es decir no podemos decir ni que tuvo un efecto terapéutico, ni que no lo tuvo. La comparativa entre el VP2.51 y la fluoxetina demostró

que en esta prueba la fluoxetina es más efectiva que el VP2.51 como tratamiento antidepresivo.

Creemos que la ausencia de resultados del VP2.51 en el FST es debido a la duración del tratamiento. Es sabido que el protocolo del UCMS es poco replicable, si a esto le sumamos diferentes diseños experimentales en la duración del UCMS o del tratamiento farmacológico el resultado es que se hace extremadamente complejo comparar los resultados obtenidos. Está descrito que el tratamiento con fluoxetina durante las 2 últimas semanas de un protocolo de UCMS de 6 es suficiente para revertir la conducta de tipo depresivo (Bessa, Ferreira et al. 2009). Por esta razón decidimos sacrificar nuestro tiempo de administración habitual de 3 semanas y testar nuestro fármaco a las dos semanas, tiempo suficiente para que la fluoxetina ejerza su efecto. A tenor de los resultados resulta evidente que el inhibidor de la GSK-3 VP2.51 es menos eficiente que la fluoxetina. Sin embargo sería interesante repetir el experimento con una duración del tratamiento de al menos 3 semanas y media.

Como se ha dicho previamente, hay dos trabajos publicados que describen el efecto de los inhibidores de la GSK-3 en un modelo de UCMS (Silva, Mesquita et al. 2008, Ma, Dang et al. 2013). Así como un trabajo que describe el efecto de la sobre-expresión de la GSK-3 β en la susceptibilidad del UCMS (Zhang, Song et al. 2013). Mientras la sobre-expresión ha mostrado inducir un efecto depresivo y una mayor susceptibilidad al protocolo del UCMS, el tratamiento crónico con AR-A014418 ha mostrado revertir el efecto del UCMS y el tratamiento agudo con el SB216763 no ha mostrado efecto alguno. Resultan de especial relevancia estos dos últimos trabajos por varias razones.

En primer lugar porque nos indica que la duración del tratamiento es importante para ver efectos terapéuticos con los inhibidores de la GSK-3. Algunos compuestos como la ketamina tienen un efecto duradero antidepresivo y una única administración es suficiente para recuperar la conducta de tipo depresivo en un FST, sin embargo los inhibidores de la GSK-3 no muestran dicha capacidad (Ma, Dang et al. 2013).

En segundo lugar que la pauta de administración también es importante. Se ha visto que el AR-A014418 revierte el estado depresivo si se inyecta durante 10 días

conjuntamente con la aplicación del UCMS (Silva, Mesquita et al. 2008). En este último trabajo no podemos decir que el tratamiento ejerza un efecto curativo sobre animales deprimidos por dos motivos. El motivo número uno es que se trata de un UCMS de 10 días de duración y consideramos que es muy corto para decir que es un modelo de MDD. Aunque algunos autores han descrito alteraciones neurobiológicas similares a las vistas en pacientes con MDD con protocolos de 7 a 10 días de UCMS, otros autores no han visto dichas alteraciones. Es más, si se revisan los diferentes trabajos que realizan UCMS, la mayoría de autores prefiere hacer protocolos más largos (Hill, Hellemans et al. 2012). Y el motivo número dos es que no sabemos si el fármaco está curando o previniendo los efectos del UCMS. Recuérdese que en el capítulo 3: Estudios *in vivo* del efecto del VP2.51. Efecto crónico del fármaco en conductas hipocampo-dependientes. Validez predictiva, se discutió sobre la posible protección que proporcionaban las células a las que el fármaco había aumentado su supervivencia, pero que el mismo protocolo había propiciado su muerte. De modo que en este paradigma experimental donde se co-administra el inhibidor y el protocolo del UCMS, el fármaco puede estar ejerciendo un efecto protector.

Aunque los resultados parecen desesperanzadores en la potencialidad del fármaco como antidepresivo para aquellas situaciones similares a las que genera el protocolo del UCMS utilizado en esta tesis, no debemos olvidar que esto es un modelo experimental de MDD. El resultado realmente importante en lo que a potencialidad antidepresiva, para nosotros es el que se refiere a el FST sólo, sin otras pruebas o estreses en paralelo, donde hemos observado una clara disminución del tiempo de inmovilidad. El resto de estudios estuvieron destinados a conocer más sobre los efectos del VP2.51 en diferentes condiciones experimentales relacionadas con conductas depresivas y/o la depresión y a conocer cómo el efecto antidepresivo del fármaco tenía un correlato histológico-conductual.

6. 3 Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en el volumen de la formación hipocampal.

El hallazgo más sistemático en los cambios intracelulares, estructurales y en neuroplasticidad en la MDD consiste en una disminución significativa del volumen del

hipocampo. Este cambio volumétrico se relacionaría con la duración del episodio depresivo. Asimismo, no es privativo de la depresión. Por ejemplo los pacientes diagnosticados con el síndrome de Cushing, también conocido como hipercortisolismo, han mostrado tener reducido el volumen hipocampal (Starkman, Gebarski et al. 1992).

El UCMS es un modelo de MDD basado en la exposición a diferentes estreses. En roedores se han visto reducciones del volumen hipocampal en animales expuestos a estreses de diferente naturaleza (Lee, Jarome et al. 2009, Pereda-Perez, Popovic et al. 2013). Nosotros, como se mostró en resultados, hemos detectado una reducción del volumen hipocampal en los grupos vehículo y VP2.51 inducida por el UCMS. La fluoxetina sin embargo no mostró diferencias significativas con ningún grupo experimental. Al igual que nosotros, estudios realizados por otro grupo han mostrado reducciones volumétricas en diferentes subregiones hipocampales de animales sometidos a un UCMS de 6 semanas, así como una reversión de estos cambios atróficos tras 2 semanas de tratamiento con fluoxetina (Bessa, Ferreira et al. 2009). Nosotros por el contrario no observamos una reversión por el uso de la fluoxetina. Creemos que esto se debe al protocolo de UCMS utilizado ya que la dosis de fluoxetina es análoga.

Nuestros resultados significan en términos biológicos que nuestro modelo de MDD replica las alteraciones volumétricas descritas en pacientes diagnosticados con depresión. El tratamiento farmacológico con VP2.51 no recuperó la reducción volumétrica inducida por el UCMS y la fluoxetina ni incrementó el volumen respecto al grupo vehículo y VP2.51 ni la disminuyó respecto al control, es decir que se quedó a medio camino. Creemos que la falta de recuperación se debe a la longitud del tratamiento. Es conocido que se necesitan en torno a 4-6 semanas de tratamiento en humanos para observar mejora clínica. Hipotetizamos que tiempos de administración más largos podrían haber revertido los efectos atróficos detectados.

6. 4 Estudio del efecto del VP2.51 y la fluoxetina, en un modelo de MDD, en la neurogénesis hipocampal adulta.

La teoría neurogénica de la depresión propone que los cambios volumétricos descritos en pacientes de MDD son debidos a alteraciones de la AHN. Actualmente

sabemos que los cambios volumétricos descritos en el hipocampo tienen relación con cambios en la plasticidad sináptica y la arborización dendrítica y no a una alteración del número de neuronas granulares del GD (Sousa, Lukoyanov et al. 2000, Bessa, Ferreira et al. 2009, Lucassen, Pruessner et al. 2014). Sin embargo parece haber un consenso respecto a que la AHN está involucrada en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos (Santarelli, Saxe et al. 2003, Surget, Saxe et al. 2008, David, Samuels et al. 2009, Hanson, Owens et al. 2011, Surget, Tanti et al. 2011, Eisch and Petrik 2012, Petrik, Lagace et al. 2012, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013, Lucassen, Pruessner et al. 2014).

Si la AHN juega un papel esencial en la eficacia antidepresiva, esto conlleva algunas implicaciones clínicas interesantes. Por ejemplo, si la AHN se reduce con la edad (Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996), sería esperable que los fármacos antidepresivos no igual de eficaces en individuos jóvenes que en individuos mayores. Esto tiene lugar en paralelo con una disminución de los efectos proneurogénicos de la fluoxetina en ratones envejecidos (Couillard-Despres, Wuertinger et al. 2009). En seres humanos se han descrito efectos contradictorios. Mientras algunos autores afirman que los pacientes mayores de 60 años responden al tratamiento con fluoxetina (Tollefson, Bosomworth et al. 1995), otros autores no ven efecto alguno en los pacientes mayores de 65 años (Schatzberg and Roose 2006). También se ha visto que los antidepresivos no son capaces de estimular la AHN en pacientes mayores (Lucassen, Stumpel et al. 2010).

En lo referente a la proliferación, nuestro estudio ha determinado que sólo el grupo VP2.51 se ha visto afectado por el protocolo del UCMS, tanto al cuantificar las células en mitosis ($pH3^+$) como el ratio de células en ciclo / células que están en mitosis ($Ki67^+$). Aunque no resultó significativo, el ratio del grupo vehículo mostró una tendencia significativa con el control ($p=0,06$). Estos resultados en principio resultan contradictorios con la mayoría de trabajos que describen una disminución de la proliferación en los animales sometidos a un UCMS (Heine, Maslam et al. 2004, Goshen, Kreisel et al. 2008, Surget, Saxe et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Hanson, Owens et al. 2011, Tanti, Westphal et al. 2013). Además se ha descrito que la fluoxetina revierte dichas alteraciones en animales sometidos a un UCMS (Surget, Saxe

et al. 2008, Bessa, Ferreira et al. 2009, Nollet, Gaillard et al. 2012, Tanti, Westphal et al. 2013). Sin embargo hay algunos trabajos que describen que no hay alteraciones en la proliferación en animales sometidos a un UCMS de 19 días (Lee, Kim et al. 2006, Dagyte, Crescente et al. 2011). En humanos también curiosamente no se han visto diferencias ni en el número de células en mitosis (pH3⁺) ni en el número de células en ciclo (ki67⁺) (Boldrini, Underwood et al. 2009, Lucassen, Stumpel et al. 2010). Sin embargo si se ha visto un efecto positivo en la proliferación al tratar con antidepresivos (Boldrini, Underwood et al. 2009, Boldrini, Hen et al. 2012).

Para poder entender qué está pasando con la proliferación sería útil analizar lo que sucede con las poblaciones inmaduras y con las neuronas granulares. Se evaluó el efecto de UCMS en las poblaciones DCX⁺ y Calret⁺, así como las subpoblaciones DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺.

Para analizar el número de células inmaduras de cada población y subpoblación hay que tener en cuenta dos factores importantes, en primer lugar la densidad de células y en segundo lugar el área de la SGZ. Al analizar el área de la SGZ en los diferentes grupos experimentales se observó una reducción significativa en el área de la SGZ en el grupo VP2.51 inducida por el protocolo de UCMS, consecuentemente con la disminución volumétrica del hipocampo, sin embargo esta reducción no fue estadísticamente significativa ni con el grupo vehículo ni con el grupo tratado con fluoxetina. Aunque sólo haya diferencias significativas entre el grupo control y el VP2.51, se detectó una tendencia entre el grupo control y vehículo. Sin embargo con el grupo fluoxetina no se observó diferencias ni tendencias significativas con ninguno de los grupos.

En vista de los resultados creemos apropiado discutir que el UCMS disminuyó el área de la SGZ de los grupos vehículo y VP2.51, mientras el tratamiento con fluoxetina, de nuevo no recuperó la reducción del área de la SGZ inducida por el UCMS, pero tampoco mostró diferencias con el control. Hasta ahora, creemos que nadie ha evaluado el área de la SGZ en un modelo de MDD. Cabe remarcar que en ninguno de los experimentos anteriormente discutidos se ha visto alterado el área de la SGZ en ninguna de las condiciones experimentales.

Los resultados de las poblaciones inmaduras arrojan datos muy interesantes. En primer lugar recalcar, que ninguno de los tratamientos farmacológicos ha inducido ningún efecto en la proliferación o en la supervivencia de estas neuronas inmaduras. Sin embargo quizás lo más interesante sea el efecto específico que ha inducido el UCMS sobre la población DCX y la subpoblación DCX⁺/Calret⁻.

Aunque existen varias publicaciones que evalúan la neurogénesis en el modelo del UCMS, pocos autores han prestado atención a las poblaciones de neuronas inmaduras. Los resultados descritos parecen indicar que el UCMS disminuye significativamente la población DCX⁺ (Holderbach, Clark et al. 2007, Dagyte, Crescente et al. 2011, Nollet, Gaillard et al. 2012, de Andrade, Cespedes et al. 2013). Sólo uno de estos trabajos ha utilizado la fluoxetina como tratamiento antidepresivo y ha determinado que el tratamiento con fluoxetina revierte esta reducción (Nollet, Gaillard et al. 2012). Nosotros no observamos esa recuperación por la administración de la fluoxetina. Pensamos que esto se debe al diseño experimental, mientras ellos hacen 10 semanas de UCMS y comienzan a tratar con fluoxetina en el comienzo de la tercera semana (8 semanas de tratamiento), nosotros hacemos un protocolo de 6 semanas y empezamos a tratar al comienzo de la quinta semana (2 semanas de tratamiento).

Los resultados de la población Calret y subpoblaciones DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺ no han mostrado tener diferencias significativas por el protocolo del UCMS ni por el tratamiento farmacológico.

Que nosotros sepamos solo dos trabajos han evaluado la subpoblación DCX⁺/Calret⁻ en un protocolo de UCMS y tratados con fluoxetina (Bessa, Ferreira et al. 2009, Tanti, Westphal et al. 2013) el trabajo de Tanti *et al* evalúa además las subpoblaciones DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺. Mientras Bessa *et al* describe una disminución significativa de las células DCX⁺/Calret⁻ en su grupo UCMS-veh, este efecto se ve revertido tras el tratamiento con fluoxetina. Es sorprendente encontrar diferencias en el efecto de la fluoxetina respecto a este trabajo ya que el protocolo utilizado replica el utilizado por ellos, sin embargo cabe remarcar que ellos han trabajado con rata y nosotros con ratón.

Cuando comparamos nuestros resultados con el trabajo de Tanti *et al* observamos ciertas discrepancias en los resultados. Este trabajo divide el giro dentado en 5 regiones topográficas diferentes sobre cortes histológicos horizontales. La ausencia de recuentos totales dificulta la comparación de los resultados obtenidos (figura 77).

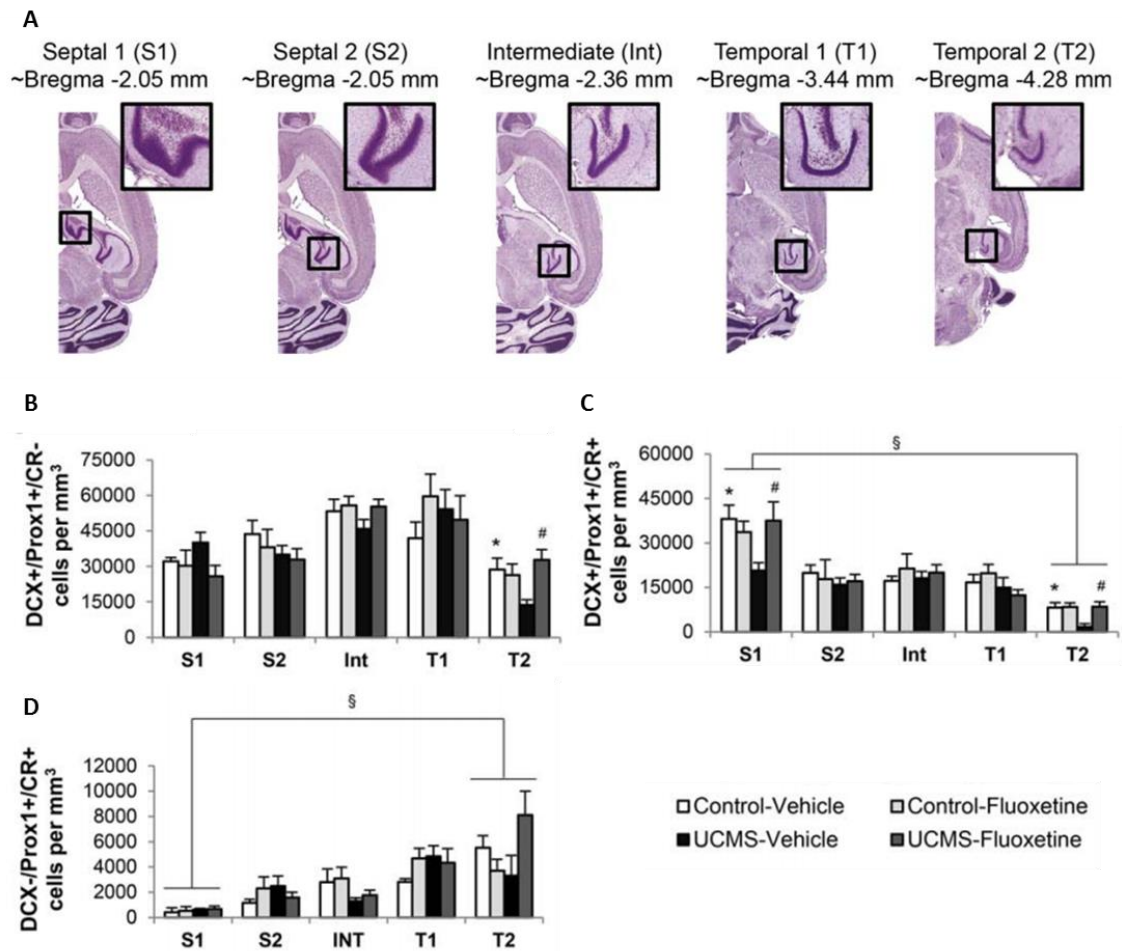


Figura 77: Efecto del UCMS en las subpoblaciones inmaduras según Tanti *et al*. (A) División topográfica del GD en cortes horizontales. (B-D) Efecto del UCMS y el tratamiento con fluoxetina en las subpoblaciones DCX⁺/Calret⁻, DCX⁺/Calret⁺ y DCX⁻/Calret⁺ respectivamente. Modificado de (Tanti, Westphal et al. 2013).

Como se observa en la figura, si sumamos de las células de cada subpoblación esperaríamos que no hubiese diferencias ni en la subpoblación DCX⁺/Calret⁻ ni en la subpoblación DCX⁻/Calret⁺. Sin embargo sí parece que habría menos células

DCX⁺/Calret⁺ en el grupo UCMS-vehículo y que esta alteración sería revertida por la fluoxetina.

Nosotros observamos justo lo contrario, no vemos alteraciones en la subpoblación DCX⁺/Calret⁺ y sí vemos cambios en la subpoblación más inmadura DCX⁺/Calret⁻. Pensamos que estas discrepancias se deben al diseño experimental, mientras nosotros hemos realizado 6 semanas de UCMS y comenzado el tratamiento farmacológico en la semana 4, cuando los animales mostraban diferencias conductuales con los animales CTR, Tanti *et al* han realizado un protocolo de UCMS de 4 semanas de duración y han administrado la fluoxetina desde el comienzo del UCMS, además su dosis de fluoxetina es el doble que la nuestra. Además si prestamos especial atención a la población más inmadura: DCX⁺/Calret⁻, Tanti *et al* cuantifican solo aquellas células que además son Prox1⁺. Si nos fijamos en el patrón de expresión de ambos marcadores (figura 79), mientras ellos cuantifican exclusivamente las células tipo 3, nosotros cuantificamos las poblaciones tipo 2b y 3 como DCX⁺/Calret⁻.

En la introducción se explicó que las exposiciones prolongadas al estrés pueden exponer al cerebro y al resto del cuerpo a concentraciones aberrantes de GC y pasar de una situación de riesgo a una patología (de Kloet, Joels et al. 2005). Aunque nuestro modelo experimental resulta algo más complejo que una simple exposición prolongada a estrés, trabajos previos han demostrado una hipersecreción de glucocorticoides en animales sometidos a un UCMS (Hill, Hellemans et al. 2012). Nosotros pensamos que nuestros resultados resultan esperables teniendo en cuenta que se ha descrito una expresión diferencial en los receptores de glucocorticoides (GRs) en las diferentes subpoblaciones de neuronas inmaduras (García, Steiner et al. 2004). Como se muestra en la figura 78, el 50% de las células DCX⁺/Calret⁻ expresan el GR, mientras las células DCX⁺/Calret⁺ no lo expresan. Creemos que esta expresión diferencial es la causante del efecto deletéreo selectivo del UCMS en la subpoblación DCX⁺/Calret⁻.

Finalmente para terminar de entender qué está ocurriendo en la AHN por el protocolo de UCMS y el efecto del tratamiento farmacológico, es fundamental analizar que está ocurriendo con el conjunto de neuronas granulares. Se utilizó el marcador Prox1 para asegurarnos que las células que contábamos eran realmente neuronas

granulares. Del mismo modo que para las neuronas inmaduras, para determinar el número total de células granulares es necesario conocer el volumen de la capa granular del giro dentado.

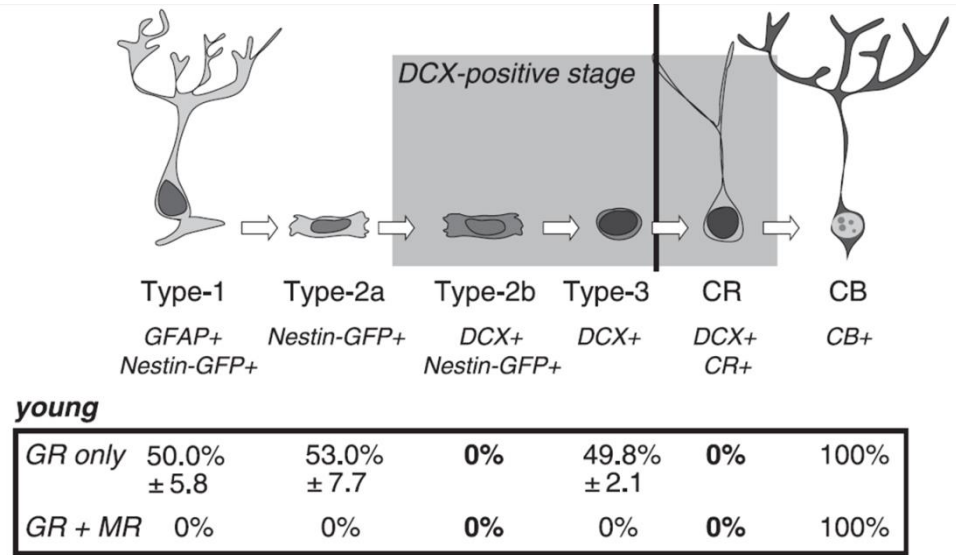


Figura 78: Patrón de expresión de los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) en las células del GD. Adaptado de (Garcia, Steiner et al. 2004).

A diferencia del área de la SGZ y volumen hipocampal, el volumen de la capa granular del giro dentado no mostró alteraciones ni por el protocolo del UCMS, ni por los tratamientos farmacológicos. El número de células granulares tampoco resultó estadísticamente significativo entre ninguno de los grupos experimentales. Esto resultaba esperable ya que no se han descrito alteraciones en el número de células granulares en animales sometidos a un protocolo de UCMS (Bessa, Ferreira et al. 2009). Recientemente se ha publicado un trabajo que no observa alteraciones ni en la densidad ni en el número total de neuronas granulares en el tejido *post-mortem* de pacientes diagnosticados con MDD y sujetos controles. Tampoco se observaron alteraciones en el volumen del soma celular de las neuronas granulares. Sin embargo sí vieron una correlación entre el tiempo de la enfermedad de pacientes no medicados y la densidad de células granulares, siendo menor en los pacientes con más tiempo de enfermedad. Curiosamente también han descrito que el tiempo de tratamiento con

antidepresivos correlaciona con un aumento del número de neuronas granulares (Cobb, Simpson et al. 2013).

Nosotros hemos visto que los animales tratados con el VP2.51 y la fluoxetina tienen significativamente una densidad mayor. Sin embargo para discutir este resultado creemos necesario recapitular los resultados previamente comentados y ponernos en un contexto global. A continuación se muestra una figura donde se esquematizan los marcadores que hemos utilizado y las células que expresan dichos marcadores.

Por tanto, si analizamos los datos en conjunto podemos sacar varias conclusiones importantes. La primera es que el protocolo de UCMS ha inducido un comportamiento depresivo evaluable en un FST. Esta misma prueba nos ha indicado que la fluoxetina ha ejercido un efecto antidepresivo y que el VP2.51 ha ejercido un efecto antidepresivo parcial. Sin embargo lo realmente interesante es ver como estos cambios conductuales correlacionan con los cambios histológicos.

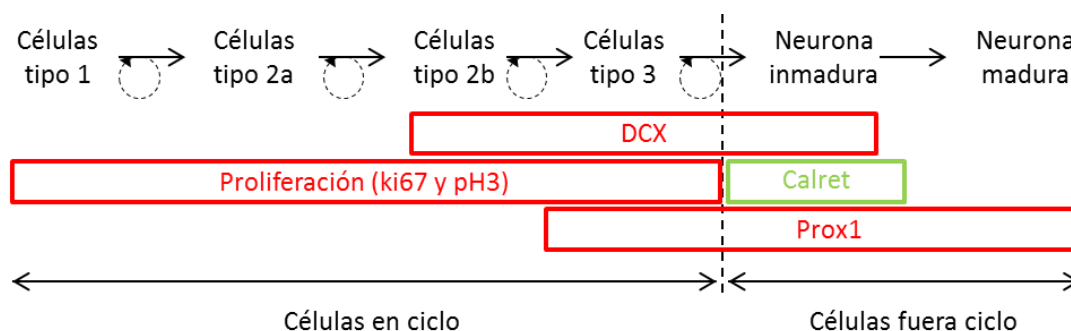


Figura 79: Esquema de los marcadores utilizados y las células que expresan dichos marcadores. El color rojo o verde indica el color del fluorocromo utilizado en la inmunohistoquímica.

Como hemos repetido en varias ocasiones, se piensa que la AHN está involucrada en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos (Santarelli, Saxe et al. 2003, Surget, Saxe et al. 2008, David, Samuels et al. 2009, Hanson, Owens et al. 2011, Surget, Tanti et al. 2011, Eisch and Petrik 2012, Petrik, Lagace et al. 2012, Mateus-Pinheiro, Pinto et al. 2013, Lucassen, Pruessner et al. 2014). Estos trabajos se han basado en la

inducción de un estado depresivo mediante diferentes protocolos y la ablación de la neurogénesis. Sin embargo la afirmación de que la AHN está involucrada en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos resulta algo más compleja, ya que los resultados obtenidos dependen del protocolo utilizado para inducir el estado depresivo y la prueba para evaluar el comportamiento depresivo así como del antidepresivo utilizado. Un caso muy claro es el trabajo de Bessa *et al* en el que observan que mientras la ablación de la neurogénesis disminuye la eficacia ansiolítica (y antidepresiva según algunos autores) de la fluoxetina en la prueba del NSF (del inglés Novelty Suppressed Feeding) esta alteración no se observa en la prueba del FST (Bessa, Ferreira et al. 2009). Lo mismo ocurre cuando evalúan la imipramina. Curiosamente, otros autores no ven una disminución de la eficacia de la imipramina en un NSF (Surget, Saxe et al. 2008). Estos resultados aunque parecen contradictorios responden a diseños experimentales muy diferentes ya que un trabajo es en rata y otro en ratón, además la duración del UCMS varía, el comienzo del tratamiento y la duración también difieren y finalmente el método de ablación de la AHN no es el mismo. Esto nos indica la necesidad de ahondar más en el estudio de los fármacos antidepresivos y sus mecanismos de acción.

Nuestro diseño experimental no evalúa el efecto de la ablación, en su lugar nos centramos en los cambios histológicos que induce el protocolo del UCMS y posteriormente estudiamos si el tratamiento farmacológico revierte dichas alteraciones. Sería esperable, al menos en el grupo de la fluoxetina que ha demostrado ejercer un efecto antidepresivo, observar una reversión de las alteraciones histológicas relacionadas con la AHN si su eficiencia depende de esta. El grupo VP2.51 también resulta sumamente interesante porque nos contesta a una pregunta muy importante: Si el fármaco ha sido capaz de ejercer su efecto proneurogénico y sin embargo no ha conseguido aliviar la conducta depresiva, ésto nos indicaría que aunque en el mecanismo de actuación de los antidepresivos esté involucrada la AHN, un efecto proneurogénico no es suficiente para curar la depresión.

Los resultados histológicos sin embargo son difíciles de evaluar y entender en conjunto. A continuación se discutirá la visión que tenemos de lo que ha inducido el UCMS y los diferentes tratamientos farmacológicos.

Uno de los resultados más destacables es la disminución del volumen hipocampal. Trabajos previos han demostrado que esta alteración responde a una retracción del árbol dendrítico y de los botones sinápticos (Sousa, Lukoyanov et al. 2000, Bessa, Ferreira et al. 2009), además vemos que la fluoxetina es capaz de revertir esa alteración hasta valores del grupo control. Esto nos da una pista de que la remodelación del árbol dendrítico puede ser necesaria para poder ver mejoras conductuales en el FST. Sin embargo resulta curioso que el grupo VP2.51, que muestra los valores medios más bajos de volumen hipocampal sí muestre un efecto antidepresivo parcial. Esto nos indica que aunque es necesaria la reversión de esta alteración, no es el único jugador en esta partida.

Siguiendo con la misma metáfora, la depresión es un partido donde juegan muchos jugadores. Pensamos que uno de los jugadores es la AHN. Esta resulta a su vez un complejo sistema de neuroplasticidad y es necesario ver el panorama completo para entender qué papel juega en la patología y en la eficiencia del tratamiento antidepresivo.

En primer lugar pasaremos a discutir los resultados obtenidos para el grupo vehículo. Como se ha discutido previamente, el UCMS ha ejercido un efecto en la AHN. Se ha descrito que este grupo tiene una media de grupo inferior, no significativa, de células en mitosis en comparación con el grupo control. Sin embargo curiosamente las células en ciclo (ki67) muestran lo contrario, una media de grupo superior, no significativa, respecto al grupo control. Si observamos el ratio ki67/pH3 vemos que el grupo vehículo tiene una tendencia respecto al grupo control a tener menos células en mitosis en relación con el número de células en ciclo. Esto nos indica que aunque el sistema esté probablemente intentando revertir los efectos deletéreos en la población más inmadura $DCX^+/Calret^-$, no es capaz de aumentar de manera eficiente la proporción de células que estando en ciclo, entran en mitosis. Otra lectura sería hipotetizar que la UCMS ha alargado la longitud del ciclo, y por eso vemos más células Ki67, sin embargo el número de células que entran en mitosis es menor. Sin embargo es importante tener en cuenta que en la AHN hay varios tipos celulares en ciclo (figuras 9 y 79).

La población $DCX^+/Calret^-$ es especialmente relevante porque son células inmaduras, con capacidad de división y son sensibles a los glucocorticoides. Creemos que el efecto que induce la elevación de los glucocorticoides por el protocolo del UCMS es una disminución de la supervivencia. Hablamos de supervivencia porque si nos fijamos en los datos, mientras hay una reducción evidente y significativa de la subpoblación, los efectos en la proliferación solo marcan una tendencia. Pensamos que la reducción de la supervivencia de la subpoblación $DCX^+/Calret^-$ ha contribuido a disminuir las medias grupales de las subpoblaciones $DCX^+/Calret^+$ y $DCX^-/Calret^-$, aunque no han llegado a ser significativas. Como era esperable el número total de neuronas granulares no se ha visto afectado por el UCMS.

Cuando evaluamos el grupo fluoxetina observamos que el tratamiento ha ejercido, como era esperable, un efecto antidepresivo, sin embargo histológicamente no vemos que se reviertan todos los efectos inducidos por el UCMS. Esto significa, que como ya algunos autores han apuntado previamente, no parece necesaria una AHN intacta, o al menos no todos sus componentes, para que el fármaco antidepresivo ejerza su acción. Dicho de otra manera, hay unas poblaciones implicadas directamente en el efecto de los fármacos antidepresivos y otras no. Esto no resultaría sorprendente, ya que en otros ámbitos se han visto que diferentes estadios de maduración tienen implicaciones funcionales específicas.

En este modelo de MDD y con un tiempo de tratamiento de 2 semanas, el VP2.51 ha mostrado un efecto antidepresivo parcial, sin embargo cuando evaluamos la histología vemos que este grupo no ha revertido ninguna de las alteraciones que ha inducido el UCMS. Sólo se ha observado un aumento significativo de la densidad de células granulares en el GD, este incremento va acompañado de un aumento no significativo de la media grupal del número total de células Prox1. Este efecto es común con la fluoxetina. Como se observa en la figura 79, la expresión de células Prox1 comienza en las células tipo 3, sin embargo la mayoría de estas células, numéricamente hablando, son células granulares maduras. Este dato resulta de especial relevancia, porque aunque no hayamos visto efecto en las poblaciones inmaduras y en la proliferación, el número total de células si tiende a ser superior. Esto nos puede estar indicando que quizás el proceso neurogénico no sea tan

importante *per se*, sino como mecanismo para aumentar el número de células maduras que son las que realmente están integradas en el circuito y participan activamente en el síndrome de la depresión. A favor de esta hipótesis está el estudio que previamente nombramos, donde se ha visto que el tiempo de tratamiento con antidepresivos correlaciona con un incremento en el número total de células granulares en pacientes depresivos (Cobb, Simpson et al. 2013). Además está descrito que la vía canónica de *Wnt* regula la expresión de *Prox1* la vía canónica (Karalay, Doberauer et al. 2011), por tanto resulta esperable que la inhibición incremente la expresión y la diferenciación neural.

En la búsqueda de los mecanismos de actuación de los antidepresivos no podemos obviar otras estructuras muy relevantes en el síndrome de la depresión como son la amígdala, el hipotálamo, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal y orbitofrontal. Sin embargo en esta tesis nos hemos centrado en los efectos antidepresivos mediados por la regulación de la AHN en el GD de la formación hipocampal.

7. Efectos adversos y fenotipado conductual en animales tratados crónicamente con el inhibidor VP2.51.

Como ya se ha comentado,, la GSK-3 es una quinasa muy conservada en el reino animal. A diferencia de otras quinasas, la GSK-3 es constitutivamente activa en condiciones normales y en respuesta a cascadas metabólicas se inhibe su actividad. Estos dos hechos sugieren que la GSK-3 tiene implicaciones funcionales en nuestros sistemas que no podemos obviar cuando utilizamos inhibidores de la enzima.

Sin embargo existe una extensa bibliografía que avala la necesidad de una correcta regulación de la GSK-3 para el buen funcionamiento del sistema. En humanos, la sobre-actividad de la GSK-3 se ha visto implicada en procesos patológicos como en la demencia de tipo Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la depresión mayor, la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Kozlovsky, Belmaker et al. 2002, Hu, Zhang et al. 2003, Hye, Kerr et al. 2005, Karege, Perroud et al. 2007, Lovestone, Killick et al. 2007,

Saus, Soria et al. 2010, Forlenza, Torres et al. 2011, Karege, Perroud et al. 2012). Por estas razones se ha hecho un gran esfuerzo en el diseño de inhibidores selectivos de la GSK-3 que sean capaces de regular esta actividad.

En la actualidad, los únicos principios activos con actividad inhibitoria de la GSK-3 conocida que se han utilizado en la práctica clínica son el Litio y el VPA. Mientras el uso de Litio está indicado como profilaxis y en el tratamiento de los trastornos bipolares y la depresión mayor recurrente, el VPA está indicado en el tratamiento de ciertos tipos de epilepsias y en los trastornos bipolares (Vademecum 2013). De acuerdo al servicio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, hay 15 moduladores de la actividad de la GSK-3 que han pasado o están en fase de ensayo clínico. Aunque la mayoría de los ensayos son con el Litio, también encontramos el inhibidor ATP-no competitivo NP031112 (Dominguez, Fuertes et al. 2012). Además recientemente se han publicado dos artículos de ensayos clínicos con inhibidores de la GSK-3 (del Ser, Steinwachs et al. 2013, Georgievska, Sandin et al. 2013) y uno con estudios de farmacocinética en humanos (Zamek-Gliszczyński, Abraham et al. 2013). Todo esto pone de manifiesto la existencia de un gran interés científico en la aplicación de moléculas relacionadas con la GSK-3 a la práctica clínica.

A la hora de desarrollar nuevas moléculas con actividad inhibitoria de la GSK-3, es fundamental disponer de estudios preclínicos que avalen la seguridad y eficacia antes de pasar a los ensayos clínicos en humanos. El objetivo principal de este tipo de estudios es establecer el perfil de seguridad de la molécula y las expectativas de eficacia que más tarde deberán confirmarse en las etapas clínicas. Por tanto los diferentes estudios a desarrollar en cualquier nueva molécula serán estudios de seguridad sobre funciones y órganos vitales, estudios de farmacocinética animal, evaluación de la toxicidad en dosis única, evaluación de posibles mutaciones y alteraciones cromosómicas, estudios en reproducción etc. Además por tratarse de una diana implicada en procesos neurológicos deberán además establecerse diversos ensayos de neurotoxicidad. Entre ellos y según las guías establecidas por la conferencia internacional de armonización (ICH, del inglés International Conference on Harmonisation) deben tenerse en cuenta la actividad motora, cambios en el comportamiento, coordinación, reflejos sensitivo-motores y temperatura corporal.

Se evaluó si el tratamiento farmacológico, dentro del apartado de neurotoxicidad, causó alguna alteración en el comportamiento. Se evaluó la actividad normal así como el aprendizaje y memoria a medio y largo plazo de los ratones.

Se trató a los animales durante 8 semanas para duplicar el tiempo de tratamiento hasta ahora estudiado y asegurarnos que no existían efectos conductuales no deseados por el tratamiento farmacológico. El orden de las pruebas comportamentales se diseñó con la intención de minimizar el efecto de las pruebas en la realización de la siguiente tarea comportamental.

7.1 Estudio del efecto del VP2.51 en la actividad normal de un ratón.

Los resultados obtenidos en la jaula de actividad concluyeron que el tratamiento con el VP2.51 no altera la actividad normal de los ratones. Trabajos previos con el inhibidor AR-A014418 y el NP031115 han descrito una disminución de la actividad espontánea en una prueba de campo abierto (Gould, Einat et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008). Mientras el AR-A014418 ha demostrado disminuir la actividad espontánea a una dosis de 9 mg/kg (30 μ mol/kg), dosis inferiores no han tenido efectos (Gould, Einat et al. 2004, Rosa, Kaster et al. 2008). Sin embargo el NP031115 disminuyó la actividad espontánea a una dosis de 5 mg/kg (Rosa, Kaster et al. 2008). Estos resultados contrastan con la ausencia de alteraciones observada en modelos genéticos donde ni el ratón GSK-3 β ^{+/-} ni el ratón que sobre-expresa la GSK-3 β muestran alteraciones en la actividad normal (Hernandez, Borrell et al. 2002, Kimura, Yamashita et al. 2008). Contrariamente, se ha descrito que el modelo genético carente de la GSK-3 α presenta un aumento de la actividad en una prueba de campo abierto (Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009).

Esta heterogeneidad bibliográfica puede deberse a los diferentes modelos experimentales. *A priori*, los estudios más relevantes para nosotros son aquellos realizados con inhibidores de la GSK-3. Los efectos observados en la actividad normal de dichas publicaciones se deben a la utilización de dosis altas de inhibidores de la GSK-3. En esos mismos trabajos, dosis inferiores no han mostrado efectos en la actividad normal, sin embargo esas dosis inferiores no han tenido efectos terapéuticos en el FST. Posiblemente la ausencia de efectos terapéuticos se deba a la pauta de

administración, mientras ambos trabajos realizan una única administración. Concluimos que nuestro trabajo demuestra que el tratamiento con VP2.51 a una dosis de 2,5 mg/kg durante 3 semanas y media ha mostrado tener efectos terapéuticos con ausencia de efecto secundarios en la actividad normal. Es conveniente tener este hecho en cuenta a la hora de plantearse en un nuevo experimento, unas dosis mayores de VP2.51 en un modelo de MDD. Nosotros apostaríamos en su lugar por un tratamiento de una duración mayor, con la misma dosis usada por nosotros.

7.2 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la memoria a corto plazo, la memoria a largo plazo y la reactivación de la memoria.

Mientras el aprendizaje se refiere al proceso por el cual el sistema nervioso adquiere una nueva información, la memoria se refiere a la codificación, almacenamiento y la recuperación cortical de la información aprendida. Ambos procesos están inextricablemente unidos.

El aprendizaje y la memoria son fenómenos complejos que requieren la interacción coordinada de múltiples regiones cerebrales. La memoria carece de una localización cerebral. Esta es un cambio más o menos permanente en los circuitos neurales corticales que procesan la información. En el aprendizaje, las principales áreas implicadas son: la zona medial del lóbulo temporal (hipocampo y amígdala) y la zona medial del diencefalo (tubérculos mamilares hipotalámicos, núcleo mediodorsal del tálamo).

Se puede hablar temporalmente de 2 tipos de memoria; la memoria a corto plazo o de trabajo (de segundos a horas) y la memoria a largo plazo (de días a años). Todas estas memorias pueden evolucionar en el olvido.

Mientras la memoria a corto plazo no conlleva la síntesis de nuevas proteínas sino el recambio de proteínas preexistente y modificaciones transitorias de las espinas dendríticas, la memoria a largo plazo conlleva la consolidación de la memoria y requiere de la síntesis de nuevas proteínas (figura 80). La reactivación de la memoria se refiere al acceso a una memoria formada previamente y a su reconsolidación. Aunque la consolidación y la reconsolidación dependan de síntesis de proteínas, se

piensa que tienen lugar por diferentes vías moleculares (Dudai and Eisenberg 2004, Lee, Milton et al. 2006, Morris, Inglis et al. 2006, Kimura, Yamashita et al. 2008, Takashima 2012).

Como ya se indicó en los resultados, se ha reportado la importancia de la actividad de GSK-3 β mediando la interacción entre las dos principales formas de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés Long Term Depression). Es más, la actividad de la GSK-3 β se incrementa durante la LTD y se inhibe en la LTP (Hooper, Markevich et al. 2007, Peineau, Taghibiglou et al. 2007). También se ha descrito en modelos murinos modificados genéticamente, que el ratón heterocigoto GSK-3 $\beta^{+/-}$ y el ratón GSK-3 α necesita una actividad normal de la quinasa para la reconsolidación de la memoria y la consolidación respectivamente (Kimura, Yamashita et al. 2008, Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009). Contrariamente, estudios realizados con la infusión hipocampal del inhibidor SB 216763 han mostrado que la inhibición de la GSK-3 β no altera la reconsolidación (Chen, Stern et al. 2011, Hong, Kim et al. 2012), sin embargo sí afecta a la reactivación (Hong, Kim et al. 2012).

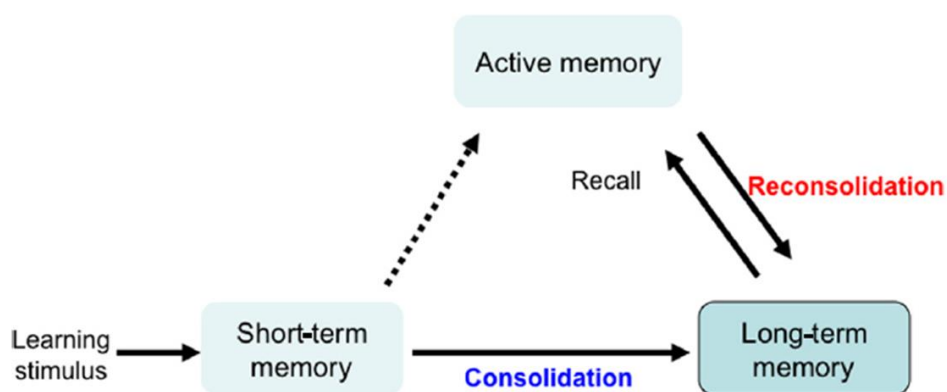


Figura 80: Mecanismo de formación de la memoria y mantenimiento (Takashima 2012).

7.2.1 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje y la memoria a corto plazo

Nuestros resultados muestran que el uso del inhibidor no produce alteraciones en el aprendizaje y en la memoria a corto plazo hipocampo dependiente. Este resultado tiene dos lecturas importantes.

En primer lugar indicar que aunque se haya reportado la importancia de la actividad de GSK-3 β mediando la interacción entre las dos principales formas de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long Term Potentiation) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés Long Term Depression), la inhibición de la quinasa no induce efectos deletéreos ni en el proceso de aprendizaje espacial, ni en la memoria a corto plazo en un MWM. Esto resulta esperable ya que la LTD y LTP tienen un componente temprano y un componente tardío. El componente temprano sería la base molecular del aprendizaje y la memoria a corto plazo, mientras el componente tardío se referiría a la memoria a largo plazo. Además hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron sobre rodajas de hipocampo, y aunque la LTD y la LTP se han propuesto como mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria, los trenes de estímulos utilizados en esta técnica no son un proceso fisiológico normal.

En segundo lugar, que el efecto proneurogénico no es suficiente para generar un efecto procognitivo en nuestro modelo experimental. Aunque los efectos cognitivos del aumento de la AHN son controvertidos, varios autores han descrito que un aumento de la neurogénesis tiene un efecto procognitivo en el aprendizaje y la memoria (Kempermann, Kuhn et al. 1997, Kempermann, Kuhn et al. 1998, van Praag, Kempermann et al. 1999, van Praag, Shubert et al. 2005, Clark, Brzezinska et al. 2009). Sin embargo otros autores no ven correlato entre el incremento de la neurogénesis y un efecto procognitivo (Morcuende, Gadd et al. 2003). Nosotros, como demuestran los resultados, no vemos dicho correlato histológico-funcional.

El papel que juega la AHN en la cognición, el aprendizaje y la memoria son, probablemente, más complejos que lo que puede llegar a determinarse con las pruebas clásicas de aprendizaje y memoria hipocampo-dependiente, y está claramente más allá del objetivo de la presente tesis doctoral.

7.2.2 Estudio del efecto del VP2.51 en el aprendizaje, la consolidación, la reactivación y reconsolidación de la memoria a largo plazo.

Se realizaron diversas pruebas, de diferente naturaleza, con el fin de obtener una evaluación lo más completa posible sobre los posibles efectos del tratamiento en conductas relacionadas con la memoria a largo plazo. También se evaluó la reactivación de la memoria y la reconsolidación.

La ausencia de alteraciones en la evitación pasiva (PA), el reconocimiento de objetos (NOR) y en el MWM, nos indican la idoneidad de usar este fármaco a una dosis de 2,5 mg/kg con una duración de hasta 6 semanas de tratamiento, sin observar efectos adversos en la cognición.

Sin embargo cabe prestar una especial atención a los resultados obtenidos en la prueba del PA. Aunque las latencias de escape del día de la prueba no resultaron estadísticamente significativas, si mostraron una tendencia. Esta tendencia converge con el trabajo de *Hong et al*, que describen una alteración de la reactivación de la memoria en un PA (Hong, Kim et al. 2012). Comparando los resultados obtenidos en el MWM y el NOR, nos parece curioso que sólo se altere la reactivación en el PA, y sin embargo no veamos ningún atisbo de alteración en las otras memorias evaluadas. Pensamos que ésto se debe, no tanto al proceso de reactivación de la memoria, si no a un proceso relacionado con una disminución de la percepción del dolor. A favor de esta hipótesis está, que todas las alteraciones en los procesos de consolidación, reactivación, reconsolidación se han descrito cuando las pruebas comportamentales se han basado en la aplicación una descarga eléctrica, (PA y condicionamiento al miedo) (Kimura, Yamashita et al. 2008, Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009, Hong, Kim et al. 2012). Esta interpretación puede estar validada por un trabajo en el que se ha descrito que el inhibidor de la GSK-3 AR-A014418 disminuye el dolor neuropático (Mazzardo-Martins, Martins et al. 2012). Es más, se ha demostrado que la inhibición de la GSK-3 reduce la tolerancia al tratamiento crónico con morfina (Liao, Tsai et al. 2014).

8. Mecanismos de acción del VP2.51

Hasta la fecha, los indicios experimentales apuntan al hipocampo y a la corteza prefrontal como las dos estructuras más importantes en la patogénesis de la MDD. Se han visto alteraciones de ambas estructuras en tejidos *postmortem* (Stockmeier, Mahajan et al. 2004, Gilabert-Juan, Varea et al. 2012, Martins-de-Souza, Guest et al. 2012, Oh, Son et al. 2012, Duric, Banasr et al. 2013). Además está descrito que la expresión del mensajero de la GSK-3 β está aumentada en tejido *postmortem* de sujetos suicidas, siendo este aumento especialmente significativo en el hipocampo y la corteza prefrontal (Pandey, Dwivedi et al. 2009). También se ha visto en el hipocampo un aumento la expresión del RNA mensajero de la GSK-3 β en tejido *postmortem* de pacientes diagnosticados con MDD (Oh, Park et al. 2010) y una disminución de la pGSK-3 y β -catenina en corteza prefrontal (Karege, Perroud et al. 2012). Por estas razones, se evaluó el efecto del inhibidor de la GSK-3 en estas estructuras.

Como se detalló en los resultados, el inhibidor ATP-competitivo de la GSK-3 VP2.51 fue capaz de incrementar las concentraciones de la β -catenina en muestras de hipocampo a las 6 horas de la administración. Aunque no vimos alteración significativa de la cantidad de la β -catenina en las muestras de corteza prefrontal medial (mPFC), si se detectó una fuerte tendencia ($p=0,054$). Consideramos que el sumatorio de los estudios *in vitro* de permeabilidad de la BHE y el estudio *in vivo* en hipocampo y mPFC son suficientes para validar el efecto inhibitorio del VP2.51 en la GSK-3 *in vivo*.

Aunque en la literatura existen numerosos artículos que describen los efectos de los inhibidores de las GSK-3 en diferentes condiciones experimentales, pocos son los artículos que encontramos que determinen *in vivo* los efectos de un inhibidor de la GSK-3 en la cantidad de β -catenina en tejido hipocampal o mPFC. El péptido inhibidor de la GSK-3 L803-mts ha mostrado incrementar la expresión del RNA mensajero de la β -catenina en tejido hipocampal a partir de los 30m, llegando a su punto máximo a las 24h de la administración (Kaidanovich-Beilin, Milman et al. 2004). Un trabajo con litio inyectado 24 horas antes del sacrificio ha demostrado disminuir la cantidad de β -catenina en tejido prefrontal, sin embargo no ha visto diferencias en tejido hipocampal

(Boer, Cierny et al. 2008). Las discrepancias entra la poca bibliografía que existe al respecto nos dificulta la discusión de estos datos.

La detección de un aumento de la pGSK-3 β (ser9) al mismo tiempo que el incremento de la β -catenina puede estar indicando que estos dos hechos estén relacionados. Desconocemos el mecanismo por el cual un inhibidor puede desencadenar la fosforilación en el residuo de regulación inhibitoria, sin embargo otros autores han visto este mismo efecto con otros inhibidores *in vitro* (Simón Sanz 2009). Sin embargo, no se han observado diferencias en la cantidad total de GSK-3 β y GSK-3 α en ningunas de las condiciones evaluadas.

Creemos que aunque sólo hayamos detectado un aumento significativo de la β -catenina en muestras de hipocampo, el sumatorio del trabajo *in vitro* e *in vivo* demuestra que está habiendo una inhibición real de la GSK-3 en tejido cerebral y esta inhibición media los efecto histológicos y terapéuticos descritos a lo largo de esta tesis doctoral.

CONCLUSIONES

I. El tratamiento farmacológico con VP2.51, inhibidor ATP-competitivo de la GSK-3, a una dosis de 2,5 mg/kg y durante regímenes de administración variables demostró:

1. Ser suficiente para inducir un efecto proneurogénico en la neurogénesis hipocampal adulta. El VP2.51 incrementa el número de células en proliferación, así como el número de células que adquieren linaje neuronal. Estos efectos no se restringen a la capacidad proliferativa, sino que el fármaco también es capaz de aumentar la supervivencia y/o maduración de las poblaciones inmaduras.

2. Ser un antidepresivo potencial, en una prueba de validez predictiva antidepresiva (FST). En paralelo, se incrementó la proliferación neurogénica en estos mismo animales, replicandose el resultado de la conclusión anterior. La ausencia de efectos sobre las poblaciones inmaduras puede estar relacionada con una sensibilidad específica de estas subpoblaciones inmaduras al tratamiento y la prueba comportamental.

3. Inducir un efecto terapéutico en animales estresado y/o deprimidos. Además incrementó la proliferación específicamente en la región ventral del giro dentado. Los estudios del número de neuronas inmaduras mostraron un incremento específico en el número de células de la población que expresa Calretinina y la subpoblación que expresa Doblecortina y Calretinina, como respuesta a un contexto neurogénico cambiante que busca llegar a la homeostasis tras un FST modificado.

4. Tener un efecto antidepresivo parcial en un modelo de depresión mayor (MDD). Histológicamente no fue capaz de revertir los efectos deletéreos que indujo el modelo de MDD en el volumen hipocampal, área de la SGZ, proliferación, supervivencia de la población Doblecortina y subpoblación Doblecortina⁺/Calretinina⁻ (neuronas en diferenciación). Sin embargo fue capaz de aumentar significativamente la densidad de neuronas granulares del giro dentado. El tratamiento con VP2.51 demostró ser menos eficiente que la fluoxetina.

5. Ausencia de efectos adversos en la actividad normal, en procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria o de incremento de peso. Estos resultados

demuestran que la dosis de administración es óptima para obtener un efecto terapéutico con ausencia de efectos indeseados (costes/beneficios).

6. Se ha observado un aumento significativo de la β -catenina y la forma inactiva de la GSK-3 β en tejido hipocampal a las 6 horas de la administración aguda del VP2.51. Estos resultados muestran la compleja regulación de la GSK-3 *in vivo* y validan, junto al resto de resultados, que el inhibidor de la GSK-3 VP2.51 inducen cambios moleculares y celulares a la dosis dada.

II. En la presente tesis doctoral también se ha demostrado que:

1. El protocolo modificado del FST induce un comportamiento de tipo estresado y/o deprimido. Además induce una disminución de la proliferación y/o supervivencia de las células nacidas 24h antes del FST modificado.

2. El modelo de MDD, basado en la administración de estreses leves impredecibles y durante 6 semanas (UCMS), induce una pérdida significativa del peso y los tratamientos antidepresivos con fluoxetina y VP2.51 no son capaces de revertirlo. También se ha demostrado que los parámetros del pelaje y el anidamiento no resultan especialmente útiles para evaluar la eficiencia del protocolo UCMS en la cepa C57/BL6. Finalmente se ha observado un efecto “ansiolítico anómalo” inducido por el UCMS. Creemos que esto se debe a una supresión adaptativa al miedo.

3. La fluoxetina si mostró un efecto antidepresivo en el modelo de UCMS, sin embargo no fue capaz de revertir todos los efectos deletéreos del UCMS en la AHN. Esto puede explicarse como que la AHN no es tan importante como proceso en sí, sino como mecanismo para aumentar el número de células maduras del giro dentado.

BIBLIOGRAFÍA

aan het Rot, M., S. J. Mathew and D. S. Charney (2009). "Neurobiological mechanisms in major depressive disorder." *CMAJ* 180(3): 305-313.

Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* 16(13): 3797-3804.

Abraham, W. C. and A. Robins (2005). "Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma." *Trends Neurosci* 28(2): 73-78.

Abrous, D. N., M. Koehl and M. Le Moal (2005). "Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology." *Physiol Rev* 85(2): 523-569.

Abusaad, I., D. MacKay, J. Zhao, P. Stanford, D. A. Collier and I. P. Everall (1999). "Stereological estimation of the total number of neurons in the murine hippocampus using the optical disector." *J Comp Neurol* 408(4): 560-566.

Ahdidan, J., L. B. Hviid, M. M. Chakravarty, B. Ravnkilde, R. Rosenberg, A. Rodell, H. Stodkilde-Jorgensen and P. Videbech (2011). "Longitudinal MR study of brain structure and hippocampus volume in major depressive disorder." *Acta Psychiatr Scand* 123(3): 211-219.

Airan, R. D., L. A. Meltzer, M. Roy, Y. Gong, H. Chen and K. Deisseroth (2007). "High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression." *Science* 317(5839): 819-823.

Aldridge, J. E., E. D. Levin, F. J. Seidler and T. A. Slotkin (2005). "Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression." *Environ Health Perspect* 113(5): 527-531.

Alonso, M. and A. Martinez (2004). "GSK-3 inhibitors: discoveries and developments." *Curr Med Chem* 11(6): 755-763.

Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." *Anat Rec* 145: 573-591.

Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." *J Comp Neurol* 137(4): 433-457.

Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* 124(3): 319-335.

Altshuler, L. L., V. Hendrick and L. S. Cohen (1998). "Course of mood and anxiety disorders during pregnancy and the postpartum period." *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 2: 29-33.

Alvarez-Buylla, A. and C. Lois (1995). "Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates." *Stem Cells* 13(3): 263-272.

Alvarez-Buylla, A. and F. Nottebohm (1988). "Migration of young neurons in adult avian brain." *Nature* 335(6188): 353-354.

Angelucci, F., L. Aloe, P. Jimenez-Vasquez and A. A. Mathe (2003). "Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression." *Int J Neuropsychopharmacol* 6(3): 225-231.

Atack, J. R., H. B. Broughton and S. J. Pollack (1995). "Inositol monophosphatase--a putative target for Li⁺ in the treatment of bipolar disorder." *Trends Neurosci* 18(8): 343-349.

Bagdy, G., G. Juhasz and X. Gonda (2012). "A new clinical evidence-based gene-environment interaction model of depression." *Neuropsychopharmacol Hung* 14(4): 213-220.

Bai, F., M. Bergeron and D. L. Nelson (2003). "Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus." *Neuropharmacology* 44(8): 1013-1021.

Bailey, K. R. and J. N. Crawley (2009). *Anxiety-Related Behaviors in Mice. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* J. J. Buccafusco. Boca Raton (FL).

Bannerman, D. M., B. K. Yee, M. A. Good, M. J. Heupel, S. D. Iversen and J. N. Rawlins (1999). "Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions." *Behav Neurosci* 113(6): 1170-1188.

Beasley, C., D. Cotter and I. Everall (2002). "An investigation of the Wnt-signalling pathway in the prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder." *Schizophr Res* 58(1): 63-67.

Beaulieu, J. M., X. Zhang, R. M. Rodriguiz, T. D. Sotnikova, M. J. Cools, W. C. Wetsel, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4): 1333-1338.

Bessa, J. M., D. Ferreira, I. Melo, F. Marques, J. J. Cerqueira, J. A. Palha, O. F. Almeida and N. Sousa (2009). "The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling." *Mol Psychiatry* 14(8): 764-773, 739.

Beurel, E. and R. S. Jope (2006). "The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways." *Prog Neurobiol* 79(4): 173-189.

Bhat, R., Y. Xue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormo, Y. Nilsson, A. C. Radesater, E. Jerning, P. O. Markgren, T. Borgegard, M. Nylof, A. Gimenez-Cassina, F. Hernandez, J. J. Lucas, J. Diaz-Nido and J. Avila (2003). "Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418." *J Biol Chem* 278(46): 45937-45945.

Bielajew, C., A. T. Konkle and Z. Merali (2002). "The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses." *Behav Brain Res* 136(2): 583-592.

Bijur, G. N. and R. S. Jope (2001). "Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta." *J Biol Chem* 276(40): 37436-37442.

Bizon, J. L. and M. Gallagher (2003). "Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline." *Eur J Neurosci* 18(1): 215-219.

Bizon, J. L., H. J. Lee and M. Gallagher (2004). "Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline." *Aging Cell* 3(4): 227-234.

Bockaert, J., S. Claeysen, C. Becamel, A. Dumuis and P. Marin (2006). "Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation." *Cell Tissue Res* 326(2): 553-572.

Boer, U., I. Cierny, D. Krause, A. Heinrich, H. Lin, G. Mayr, C. Hiemke and W. Knepel (2008). "Chronic lithium salt treatment reduces CRE/CREB-directed gene transcription and reverses its upregulation by chronic psychosocial stress in transgenic reporter gene mice." *Neuropsychopharmacology* 33(10): 2407-2415.

Boku, S., S. Nakagawa, T. Masuda, H. Nishikawa, A. Kato, Y. Kitaichi, T. Inoue and T. Koyama (2009). "Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 β and beta-catenin/TCF pathway." *Neuropsychopharmacology* 34(3): 805-815.

Boku, S., S. Nakagawa, T. Masuda, H. Nishikawa, A. Kato, N. Takamura, Y. Omiya, Y. Kitaichi, T. Inoue and I. Kusumi (2013). "Valproate recovers the inhibitory effect of dexamethasone on the proliferation of the adult dentate gyrus-derived neural precursor cells via GSK-3 β and beta-catenin pathway." *Eur J Pharmacol*.

Boldrini, M., R. Hen, M. D. Underwood, G. B. Rosoklija, A. J. Dwork, J. J. Mann and V. Arango (2012). "Hippocampal angiogenesis and progenitor cell proliferation are increased with antidepressant use in major depression." *Biol Psychiatry* 72(7): 562-571.

Boldrini, M., M. D. Underwood, R. Hen, G. B. Rosoklija, A. J. Dwork, J. John Mann and V. Arango (2009). "Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus." *Neuropsychopharmacology* 34(11): 2376-2389.

Borsini, F., A. Lecci, A. Sessarego, R. Frassine and A. Meli (1989). "Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation." *Psychopharmacology (Berl)* 97(2): 183-188.

Bouhelal, R., L. Smounya and J. Bockaert (1988). "5-HT_{1B} receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra." *Eur J Pharmacol* 151(2): 189-196.

Bradley, C. A., S. Peineau, C. Taghibiglou, C. S. Nicolas, D. J. Whitcomb, Z. A. Bortolotto, B. K. Kaang, K. Cho, Y. T. Wang and G. L. Collingridge (2012). "A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity." *Front Mol Neurosci* 5: 13.

Brandt, M. D., S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, K. Reuter, A. Bick-Sander, W. von der Behrens and G. Kempermann (2003). "Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice." *Mol Cell Neurosci* 24(3): 603-613.

Brezun, J. M. and A. Daszuta (1999). "Serotonin depletion in the adult rat produces differential changes in highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule and tenascin-C immunoreactivity." *J Neurosci Res* 55(1): 54-70.

Brummelte, S. and L. A. Galea (2010). "Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats." *Neuroscience* 168(3): 680-690.

Caberlotto, L., L. Carboni, F. Zanderigo, F. Andreetta, M. Andreoli, G. Gentile and M. Razzoli (2013). "Differential effects of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibition by lithium or

selective inhibitors in the central nervous system." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386(10): 893-903.

Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." *J Comp Neurol* 435(4): 406-417.

Castagne, V., P. Moser and R. D. Porsolt (2009). Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. J. J. Buccafusco. Boca Raton (FL).

Castano, Z., P. R. Gordon-Weeks and R. M. Kypta (2010). "The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3 β is required for axon growth." *J Neurochem* 113(1): 117-130.

Castro, J. E., E. Varea, C. Marquez, M. I. Cordero, G. Poirier and C. Sandi (2010). "Role of the amygdala in antidepressant effects on hippocampal cell proliferation and survival and on depression-like behavior in the rat." *PLoS One* 5(1): e8618.

Clark, P. J., W. J. Brzezinska, E. K. Puchalski, D. A. Krone and J. S. Rhodes (2009). "Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain." *Hippocampus* 19(10): 937-950.

Cobb, J. A., J. Simpson, G. J. Mahajan, J. C. Overholser, G. J. Jurjus, L. Dieter, N. Herbst, W. May, G. Rajkowska and C. A. Stockmeier (2013). "Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder." *J Psychiatr Res* 47(3): 299-306.

Coghlan, M. P., A. A. Culbert, D. A. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith and J. C. Holder (2000). "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription." *Chem Biol* 7(10): 793-803.

Cole, A., S. Frame and P. Cohen (2004). "Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event." *Biochem J* 377(Pt 1): 249-255.

Conde, S., D. I. Perez, A. Martinez, C. Perez and F. J. Moreno (2003). "Thienyl and phenyl α -halomethyl ketones: new inhibitors of glycogen synthase kinase (GSK-3 β) from a library of compound searching." *J Med Chem* 46(22): 4631-4633.

Connor, T. J., P. Kelliher, Y. Shen, A. Harkin, J. P. Kelly and B. E. Leonard (2000). "Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical, and endocrine changes in the forced-swim test." *Pharmacol Biochem Behav* 65(4): 591-597.

Connor, T. J., J. P. Kelly and B. E. Leonard (1997). "Forced swim test-induced neurochemical endocrine, and immune changes in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 58(4): 961-967.

Corotto, F. S., J. A. Henegar and J. A. Maruniak (1993). "Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain." *Neurosci Lett* 149(2): 111-114.

Couillard-Despres, S., C. Wuertinger, M. Kandasamy, M. Caioni, K. Stadler, R. Aigner, U. Bogdahn and L. Aigner (2009). "Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis." *Mol Psychiatry* 14(9): 856-864.

Craft, R. M., M. L. Kostick, J. A. Rogers, C. L. White and K. T. Tsutsui (2010). "Forced swim test behavior in postpartum rats." *Pharmacol Biochem Behav* 96(4): 402-412.

Cruz-Orive, L. M. (1987). "Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector." *J Microsc* 145(Pt 2): 121-142.

Chalecka-Franaszek, E. and D. M. Chuang (1999). "Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8745-8750.

Chen, D. Y., S. A. Stern, A. Garcia-Osta, B. Saunier-Rebori, G. Pollonini, D. Bambah-Mukku, R. D. Blitzer and C. M. Alberini (2011). "A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement." *Nature* 469(7331): 491-497.

Chen, G., L. D. Huang, Y. M. Jiang and H. K. Manji (1999). "The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3." *J Neurochem* 72(3): 1327-1330.

Chen, G., G. Rajkowska, F. Du, N. Seraji-Bozorgzad and H. K. Manji (2000). "Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium." *J Neurochem* 75(4): 1729-1734.

Chen, L., G. D. Salinas and X. Li (2009). "Regulation of serotonin 1B receptor by glycogen synthase kinase-3." *Mol Pharmacol* 76(6): 1150-1161.

Chen, L., W. Zhou, P. C. Chen, I. Gaisina, S. Yang and X. Li (2011). "Glycogen synthase kinase-3 β is a functional modulator of serotonin-1B receptors." *Mol Pharmacol* 79(6): 974-986.

Choudary, P. V., M. Molnar, S. J. Evans, H. Tomita, J. Z. Li, M. P. Vawter, R. M. Myers, W. E. Bunney, Jr., H. Akil, S. J. Watson and E. G. Jones (2005). "Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15653-15658.

D'Aquila, P. S., P. Brain and P. Willner (1994). "Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression." *Physiol Behav* 56(5): 861-867.

Dagyte, G., I. Crescente, F. Postema, L. Seguin, C. Gabriel, E. Mocaer, J. A. Boer and J. M. Koolhaas (2011). "Agomelatine reverses the decrease in hippocampal cell survival induced by chronic mild stress." *Behav Brain Res* 218(1): 121-128.

Dajani, R., E. Fraser, S. M. Roe, N. Young, V. Good, T. C. Dale and L. H. Pearl (2001). "Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition." *Cell* 105(6): 721-732.

Darwish, I. E., H. M. Maklad and I. H. Diab (2013). "Behavioral and neuronal biochemical possible effects in experimental induced chronic mild stress in male albino rats under the effect of oral barley administration in comparison to venlafaxine." *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 5(2): 128-136.

Datusalia, A. K. and S. S. Sharma (2014). "Amelioration of Diabetes-induced Cognitive Deficits by GSK-3 β Inhibition is Attributed to Modulation of Neurotransmitters and Neuroinflammation." *Mol Neurobiol*.

David, D. J., B. A. Samuels, Q. Rainer, J. W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D. A. Craig, B. P. Guiard, J. P. Guilloux, R. P. Artymyshyn, A. M. Gardier, C. Gerald, I. A. Antonijevic, E. D. Leonardo and R. Hen (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." *Neuron* 62(4): 479-493.

Dayer, A. G., A. A. Ford, K. M. Cleaver, M. Yassaee and H. A. Cameron (2003). "Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus." *J Comp Neurol* 460(4): 563-572.

de Andrade, J. S., I. C. Cespedes, R. O. Abrao, T. B. Dos Santos, L. Diniz, L. R. Britto, R. C. Spadari-Bratfisch, D. Ortolani, L. Melo-Thomas, R. C. da Silva and M. B. Viana (2013). "Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis." *Behav Brain Res* 250: 81-90.

de Groot, R. P., J. Auwerx, M. Bourouis and P. Sassone-Corsi (1993). "Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy." *Oncogene* 8(4): 841-847.

de Kloet, E. R., M. Joels and F. Holsboer (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." *Nat Rev Neurosci* 6(6): 463-475.

De Vivo, M. and S. Maayani (1986). "Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes." *J Pharmacol Exp Ther* 238(1): 248-253.

Dedic, N. W., S.M.; Deussing, J.M. (2011). *Mouse Models of Depression. Psychiatric Disorders - Trends and Developments*. T. Uehara, InTech.

Degroot, A. and D. Treit (2004). "Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system." *Brain Res* 1001(1-2): 60-71.

del Ser, T., K. C. Steinwachs, H. J. Gertz, M. V. Andres, B. Gomez-Carrillo, M. Medina, J. A. Vericat, P. Redondo, D. Fleet and T. Leon (2013). "Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study." *J Alzheimers Dis* 33(1): 205-215.

Delgado, P. L., H. L. Miller, R. M. Salomon, J. Licinio, J. H. Krystal, F. A. Moreno, G. R. Heninger and D. S. Charney (1999). "Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action." *Biol Psychiatry* 46(2): 212-220.

Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* 11(5): 339-350.

Diaz-Velasquez, C. E., F. Castro-Munozledo and W. Kuri-Harcuch (2008). "Staurosporine rapidly commits 3T3-F442A cells to the formation of adipocytes by activation of GSK-3 β and mobilization of calcium." *J Cell Biochem* 105(1): 147-157.

Ding, Q., W. Xia, J. C. Liu, J. Y. Yang, D. F. Lee, J. Xia, G. Bartholomeusz, Y. Li, Y. Pan, Z. Li, R. C. Bargou, J. Qin, C. C. Lai, F. J. Tsai, C. H. Tsai and M. C. Hung (2005). "Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of β -catenin." *Mol Cell* 19(2): 159-170.

Diniz, L., T. B. dos Santos, L. R. Britto, I. C. Cespedes, M. C. Garcia, R. C. Spadari-Bratfisch, C. C. Medalha, G. M. de Castro, F. T. Montesano and M. B. Viana (2013). "Effects of chronic treatment with corticosterone and imipramine on fos immunoreactivity and adult hippocampal neurogenesis." *Behav Brain Res* 238: 170-177.

Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." *J Cell Sci* 116(Pt 7): 1175-1186.

Dominguez, J. M., A. Fuertes, L. Orozco, M. del Monte-Millan, E. Delgado and M. Medina (2012). "Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib." *J Biol Chem* 287(2): 893-904.

Drapeau, E., W. Mayo, C. Aurousseau, M. Le Moal, P. V. Piazza and D. N. Abrous (2003). "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14385-14390.

Drevets, W. C., E. Frank, J. C. Price, D. J. Kupfer, D. Holt, P. J. Greer, Y. Huang, C. Gautier and C. Mathis (1999). "PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression." *Biol Psychiatry* 46(10): 1375-1387.

Du, J., Y. Wei, L. Liu, Y. Wang, R. Khairova, R. Blumenthal, T. Tragon, J. G. Hunsberger, R. Machado-Vieira, W. Drevets, Y. T. Wang and H. K. Manji (2010). "A kinesin signaling complex mediates the ability of GSK-3 β to affect mood-associated behaviors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(25): 11573-11578.

Duan, X., E. Kang, C. Y. Liu, G. L. Ming and H. Song (2008). "Development of neural stem cell in the adult brain." *Curr Opin Neurobiol* 18(1): 108-115.

Dudai, Y. and M. Eisenberg (2004). "Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis." *Neuron* 44(1): 93-100.

Dupret, D., J. M. Revest, M. Koehl, F. Ichas, F. De Giorgi, P. Costet, D. N. Abrous and P. V. Piazza (2008). "Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis." *PLoS One* 3(4): e1959.

Duric, V., M. Banasr, C. A. Stockmeier, A. A. Simen, S. S. Newton, J. C. Overholser, G. J. Jurjus, L. Dieter and R. S. Duman (2013). "Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects." *Int J Neuropsychopharmacol* 16(1): 69-82.

Eisch, A. J. and D. Petrik (2012). "Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission?" *Science* 338(6103): 72-75.

Eldar-Finkelman, H. and A. Martinez (2011). "GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS." *Front Mol Neurosci* 4: 32.

Eldar-Finkelman, H., S. A. Schreyer, M. M. Shinohara, R. C. LeBoeuf and E. G. Krebs (1999). "Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice." *Diabetes* 48(8): 1662-1666.

Elizalde, N., A. L. Garcia-Garcia, S. Totterdell, N. Gendive, E. Venzala, M. J. Ramirez, J. Del Rio and R. M. Tordera (2010). "Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression." *Psychopharmacology (Berl)* 210(3): 393-406.

Embi, N., D. B. Rylatt and P. Cohen (1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase." *Eur J Biochem* 107(2): 519-527.

Encinas, J. M., A. Vaahtokari and G. Enikolopov (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8233-8238.

Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." *Behav Brain Res* 31(1): 47-59.

Eom, T. Y. and R. S. Jope (2009). "Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α /3 β impairs in vivo neural precursor cell proliferation." *Biol Psychiatry* 66(5): 494-502.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-1317.

Esposito, M. S., V. C. Piatti, D. A. Laplagne, N. A. Morgenstern, C. C. Ferrari, F. J. Pitossi and A. F. Schinder (2005). "Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development." *J Neurosci* 25(44): 10074-10086.

Evenson, A. R., M. U. Fareed, M. J. Menconi, J. C. Mitchell and P. O. Hasselgren (2005). "GSK-3 β inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes." *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2226-2238.

Fan, G., L. M. Ballou and R. Z. Lin (2003). "Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3 β and C-terminal Src kinase by Galphaq." *J Biol Chem* 278(52): 52432-52436.

Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, K. Reuter, B. Steiner, L. P. Wang, M. Yamaguchi, H. Kettenmann and G. Kempermann (2003). "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes." *Mol Cell Neurosci* 23(3): 373-382.

Forlenza, O. V., C. A. Torres, L. L. Talib, V. J. de Paula, H. P. Joaquim, B. S. Diniz and W. F. Gattaz (2011). "Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *J Psychiatr Res* 45(2): 220-224.

Foulstone, E. J., J. M. Tavaré and F. J. Gunn-Moore (1999). "Sustained phosphorylation and activation of protein kinase B correlates with brain-derived neurotrophic factor and insulin stimulated survival of cerebellar granule cells." *Neurosci Lett* 264(1-3): 125-128.

Frame, S., P. Cohen and R. M. Biondi (2001). "A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation." *Mol Cell* 7(6): 1321-1327.

Fuentealba, L. C., E. Eivers, A. Ikeda, C. Hurtado, H. Kuroda, E. M. Pera and E. M. De Robertis (2007). "Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal." *Cell* 131(5): 980-993.

Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, M. S. Sirerol-Piquer, J. M. Garcia-Verdugo, J. Avila and F. Hernandez (2013). "Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3 β activity on adult neurogenesis." *Hum Mol Genet* 22(7): 1300-1315.

Gage, F., G. Kempermann and H. Song (2008). *Adult Neurogenesis*, CSHL press.

Gallagher-Beckley, A. J., J. G. Williams, J. B. Collins and J. A. Cidlowski (2008). "Glycogen synthase kinase 3 β -mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles." *Mol Cell Biol* 28(24): 7309-7322.

Garcia, A., B. Steiner, G. Kronenberg, A. Bick-Sander and G. Kempermann (2004). "Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus." *Aging Cell* 3(6): 363-371.

Garthe, A., J. Behr and G. Kempermann (2009). "Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies." *PLoS One* 4(5): e5464.

Garthe, A. and G. Kempermann (2013). "An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis." *Front Neurosci* 7: 63.

Garza, J. C., M. Guo, W. Zhang and X. Y. Lu (2012). "Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β /beta-catenin signaling." *Mol Psychiatry* 17(8): 790-808.

Gemma, C. and A. D. Bachstetter (2013). "The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis." *Front Cell Neurosci* 7: 229.

Georgievska, B., J. Sandin, J. Doherty, A. Mortberg, J. Neelissen, A. Andersson, S. Gruber, Y. Nilsson, P. Schott, P. I. Arvidsson, S. Hellberg, G. Osswald, S. Berg, J. Falting and R. V. Bhat (2013). "AZD1080, a novel GSK3 inhibitor, rescues synaptic plasticity deficits in rodent brain and exhibits peripheral target engagement in humans." *J Neurochem* 125(3): 446-456.

Gil-Mohapel, J., P. S. Brocardo, W. Choquette, R. Gothard, J. M. Simpson and B. R. Christie (2013). "Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain." *PLoS One* 8(9): e75125.

Gilabert-Juan, J., E. Varea, R. Guirado, J. M. Blasco-Ibanez, C. Crespo and J. Nacher (2012). "Alterations in the expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the dorsolateral prefrontal cortex of psychiatric disorder patients." *Neurosci Lett* 530(1): 97-102.

Gleeson, J. G., K. M. Allen, J. W. Fox, E. D. Lamperti, S. Berkovic, I. Scheffer, E. C. Cooper, W. B. Dobyns, S. R. Minnerath, M. E. Ross and C. A. Walsh (1998). "Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein." *Cell* 92(1): 63-72.

Goshen, I., T. Kreisel, O. Ben-Menachem-Zidon, T. Licht, J. Weidenfeld, T. Ben-Hur and R. Yirmiya (2008). "Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression." *Mol Psychiatry* 13(7): 717-728.

Gould, E., A. J. Reeves, M. S. Graziano and C. G. Gross (1999). "Neurogenesis in the neocortex of adult primates." *Science* 286(5439): 548-552.

Gould, E., C. S. Woolley and B. S. McEwen (1991). "Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death." *J Comp Neurol* 313(3): 479-485.

Gould, T. D., H. Einat, R. Bhat and H. K. Manji (2004). "AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test." *Int J Neuropsychopharmacol* 7(4): 387-390.

Gradari, S., P. Perez-Domper, R. Butler, C. Martínez-Cué, G. Polavieja and J. L. Trejo (2014). "Behavior acquisition and persistence abilities: Involvement of adult hippocampal neurogenesis." *Translational Psychiatry In Reviewers*.

Grimes, C. A. and R. S. Jope (2001). "CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium." *J Neurochem* 78(6): 1219-1232.

Groves, J. O. (2007). "Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression?" *Mol Psychiatry* 12(12): 1079-1088.

Guilloux, J. P., I. Mendez-David, A. Pehrson, B. P. Guiard, C. Reperant, S. Orvoen, A. M. Gardier, R. Hen, B. Ebert, S. Miller, C. Sanchez and D. J. David (2013). "Antidepressant and anxiolytic potential of the multimodal antidepressant vortioxetine (Lu AA21004) assessed by behavioural and neurogenesis outcomes in mice." *Neuropharmacology* 73: 147-159.

Gundersen, H. J. and E. B. Jensen (1987). "The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction." *J Microsc* 147(Pt 3): 229-263.

Gurvich, N. and P. S. Klein (2002). "Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts." *Pharmacol Ther* 96(1): 45-66.

Hagemann, T. L., R. Paylor and A. Messing (2013). "Deficits in adult neurogenesis, contextual fear conditioning, and spatial learning in a gfap mutant mouse model of alexander disease." *J Neurosci* 33(47): 18698-18706.

Hanson, N. D., M. J. Owens and C. B. Nemeroff (2011). "Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal." *Neuropsychopharmacology* 36(13): 2589-2602.

Hao, Y., T. Creson, L. Zhang, P. Li, F. Du, P. Yuan, T. D. Gould, H. K. Manji and G. Chen (2004). "Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis." *J Neurosci* 24(29): 6590-6599.

Hartigan, J. A., W. C. Xiong and G. V. Johnson (2001). "Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2." *Biochem Biophys Res Commun* 284(2): 485-489.

Hasler, G., J. W. van der Veen, T. Tumonis, N. Meyers, J. Shen and W. C. Drevets (2007). "Reduced prefrontal glutamate/glutamine and gamma-aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy." *Arch Gen Psychiatry* 64(2): 193-200.

Hastings, N. B. and E. Gould (1999). "Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells." *J Comp Neurol* 413(1): 146-154.

Haug, H. (1986). "History of neuromorphometry." *J Neurosci Methods* 18(1-2): 1-17.

Hawley, D. F. and J. L. Leasure (2012). "Region-specific response of the hippocampus to chronic unpredictable stress." *Hippocampus* 22(6): 1338-1349.

Heine, V. M., S. Maslam, J. Zareno, M. Joels and P. J. Lucassen (2004). "Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible." *Eur J Neurosci* 19(1): 131-144.

Hernandez, F., J. Borrell, C. Guaza, J. Avila and J. J. Lucas (2002). "Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments." *J Neurochem* 83(6): 1529-1533.

Hill, M. N., K. G. Hellemans, P. Verma, B. B. Gorzalka and J. Weinberg (2012). "Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression." *Neurosci Biobehav Rev* 36(9): 2085-2117.

Hock, B. J., Jr. and M. D. Bunsey (1998). "Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions." *J Neurosci* 18(17): 7027-7032.

Hoeflich, K. P., J. Luo, E. A. Rubie, M. S. Tsao, O. Jin and J. R. Woodgett (2000). "Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation." *Nature* 406(6791): 86-90.

Holderbach, R., K. Clark, J. L. Moreau, J. Bischofberger and C. Normann (2007). "Enhanced long-term synaptic depression in an animal model of depression." *Biol Psychiatry* 62(1): 92-100.

Holick, K. A., D. C. Lee, R. Hen and S. C. Dulawa (2008). "Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor." *Neuropsychopharmacology* 33(2): 406-417.

Hong, J. G., D. H. Kim, C. H. Lee, S. J. Park, J. M. Kim, M. Cai, D. S. Jang and J. H. Ryu (2012). "GSK-3 β activity in the hippocampus is required for memory retrieval." *Neurobiol Learn Mem* 98(2): 122-129.

Hooper, C., V. Markevich, F. Plattner, R. Killick, E. Schofield, T. Engel, F. Hernandez, B. Anderton, K. Rosenblum, T. Bliss, S. F. Cooke, J. Avila, J. J. Lucas, K. P. Giese, J. Stephenson and S. Lovestone (2007). "Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation." *Eur J Neurosci* 25(1): 81-86.

Hsieh, J., K. Nakashima, T. Kuwabara, E. Mejia and F. H. Gage (2004). "Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(47): 16659-16664.

Hu, J. H., H. Zhang, R. Wagey, C. Krieger and S. L. Pelech (2003). "Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." *J Neurochem* 85(2): 432-442.

Hu, M., Y. J. Sun, Q. G. Zhou, Y. P. Auberson, L. Chen, Y. Hu, C. X. Luo, J. Y. Wu, D. Y. Zhu and L. X. Li (2009). "Reduced spatial learning in mice treated with NVP-AAM077 through down-regulating neurogenesis." *Eur J Pharmacol* 622(1-3): 37-44.

Huang, G. J. and J. Herbert (2006). "Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone." *Biol Psychiatry* 59(7): 619-624.

Huang, Y., N. J. Coupland, R. M. Lebel, R. Carter, P. Seres, A. H. Wilman and N. V. Malykhin (2013). "Structural changes in hippocampal subfields in major depressive disorder: a high-field magnetic resonance imaging study." *Biol Psychiatry* 74(1): 62-68.

Hughes, K., E. Nikolakaki, S. E. Plyte, N. F. Totty and J. R. Woodgett (1993). "Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation." *EMBO J* 12(2): 803-808.

Hunsaker, M. R. and R. P. Kesner (2008). "Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear." *Neurobiol Learn Mem* 89(1): 61-69.

Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* 11(8): 539-551.

Hye, A., F. Kerr, N. Archer, C. Foy, M. Poppe, R. Brown, G. Hamilton, J. Powell, B. Anderton and S. Lovestone (2005). "Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 373(1): 1-4.

Ibarguen-Vargas, Y., A. Surget, C. Touma, R. Palme and C. Belzung (2008). "Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal." *Psychoneuroendocrinology* 33(10): 1357-1368.

Ikeda, S., S. Kishida, H. Yamamoto, H. Murai, S. Koyama and A. Kikuchi (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin." *EMBO J* 17(5): 1371-1384.

Ilouz, R., O. Kaidanovich, D. Gurwitz and H. Eldar-Finkelman (2002). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc." *Biochem Biophys Res Commun* 295(1): 102-106.

Imbeault, S., L. G. Gauvin, H. D. Toeg, A. Pettit, C. D. Sorbara, L. Migahed, R. DesRoches, A. S. Menzies, K. Nishii, D. L. Paul, A. M. Simon and S. A. Bennett (2009). "The extracellular matrix controls gap junction protein expression and function in postnatal hippocampal neural progenitor cells." *BMC Neurosci* 10: 13.

Ising, M. and F. Holsboer (2006). "Genetics of stress response and stress-related disorders." *Dialogues Clin Neurosci* 8(4): 433-444.

Jayatissa, M. N., C. Bisgaard, A. Tingstrom, M. Papp and O. Wiborg (2006). "Hippocampal cytochrome correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression." *Neuropsychopharmacology* 31(11): 2395-2404.

Jessberger, S. and G. Kempermann (2003). "Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness." *Eur J Neurosci* 18(10): 2707-2712.

Jiang, W., Y. Zhang, L. Xiao, J. Van Cleemput, S. P. Ji, G. Bai and X. Zhang (2005). "Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects." *J Clin Invest* 115(11): 3104-3116.

Jin, N., A. D. Kovacs, Z. Sui, S. Dewhurst and S. B. Maggirwar (2005). "Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death." *Neuropharmacology* 48(4): 576-583.

Joje, R. S. (1999). "Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium." *Mol Psychiatry* 4(2): 117-128.

Joje, R. S. (2011). "Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders." *Front Mol Neurosci* 4: 16.

Joje, R. S. and M. S. Roh (2006). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions." *Curr Drug Targets* 7(11): 1421-1434.

Jung, M. W., S. I. Wiener and B. L. McNaughton (1994). "Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat." *J Neurosci* 14(12): 7347-7356.

Kaidanovich-Beilin, O., T. V. Lipina, K. Takao, M. van Eede, S. Hattori, C. Laliberte, M. Khan, K. Okamoto, J. W. Chambers, P. J. Fletcher, K. MacAulay, B. W. Doble, M. Henkelman, T. Miyakawa, J. Roder and J. R. Woodgett (2009). "Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 α mutant mice." *Mol Brain* 2: 35.

Kaidanovich-Beilin, O., A. Milman, A. Weizman, C. G. Pick and H. Eldar-Finkelman (2004). "Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus." *Biol Psychiatry* 55(8): 781-784.

Kalueff, A. V. and P. Tuohimaa (2005). "Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI)." *Behav Brain Res* 160(1): 1-10.

Kalueff, A. V. and P. Tuohimaa (2005). "The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research." *J Neurosci Methods* 143(2): 169-177.

Kameyama, T., T. Nabeshima and T. Kozawa (1986). "Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models." *J Pharmacol Methods* 16(1): 39-52.

Karalay, O., K. Doberauer, K. C. Vadodaria, M. Knobloch, L. Berti, A. Miquelajauregui, M. Schwark, R. Jagasia, M. M. Taketo, V. Tarabykin, D. C. Lie and S. Jessberger (2011). "Prospero-related homeobox 1 gene (*Prox1*) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(14): 5807-5812.

Karege, F., N. Perroud, S. Burkhardt, R. Fernandez, E. Ballmann, R. La Harpe and A. Malafosse (2012). "Protein levels of beta-catenin and activation state of glycogen synthase kinase-3beta in major depression. A study with postmortem prefrontal cortex." *J Affect Disord* 136(1-2): 185-188.

Karege, F., N. Perroud, S. Burkhardt, M. Schwald, E. Ballmann, R. La Harpe and A. Malafosse (2007). "Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims." *Biol Psychiatry* 61(2): 240-245.

Karson, A., T. Demirtas, D. Bayramgurler, F. Balci and T. Utkan (2013). "Chronic administration of infliximab (TNF-alpha inhibitor) decreases depression and anxiety-like behaviour in rat model of chronic mild stress." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112(5): 335-340.

Katz, R. J. (1982). "Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit." *Pharmacol Biochem Behav* 16(6): 965-968.

Keller, M. C., M. C. Neale and K. S. Kendler (2007). "Association of different adverse life events with distinct patterns of depressive symptoms." *Am J Psychiatry* 164(10): 1521-1529; quiz 1622.

Kempermann, G. (2006). *Adult Neurogenesis. Stem Cell and Neural Development in Adult Brain*, Oxford university press.

Kempermann, G. (2012). "New neurons for 'survival of the fittest'." *Nat Rev Neurosci* 13(10): 727-736.

Kempermann, G., D. Gast, G. Kronenberg, M. Yamaguchi and F. H. Gage (2003). "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice." *Development* 130(2): 391-399.

Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner and G. Kronenberg (2004). "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus." *Trends Neurosci* 27(8): 447-452.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10409-10414.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* 386(6624): 493-495.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1998). "Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus." *J Neurosci* 18(9): 3206-3212.

Kempton, M. J., Z. Salvador, M. R. Munafo, J. R. Geddes, A. Simmons, S. Frangou and S. C. Williams (2011). "Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder." *Arch Gen Psychiatry* 68(7): 675-690.

Kendler, K. S., L. M. Karkowski and C. A. Prescott (1999). "Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression." *Am J Psychiatry* 156(6): 837-841.

Kennett, G. A., C. T. Dourish and G. Curzon (1987). "Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression." *Eur J Pharmacol* 134(3): 265-274.

Kessler, R. C. (1997). "The effects of stressful life events on depression." *Annu Rev Psychol* 48: 191-214.

Kheirbek, M. A., K. C. Klemenhagen, A. Sahay and R. Hen (2012). "Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders." *Nat Neurosci* 15(12): 1613-1620.

Kim, A. J., Y. Shi, R. C. Austin and G. H. Werstuck (2005). "Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3." *J Cell Sci* 118(Pt 1): 89-99.

Kimura, T., S. Yamashita, S. Nakao, J. M. Park, M. Murayama, T. Mizoroki, Y. Yoshiike, N. Sahara and A. Takashima (2008). "GSK-3 β is required for memory reconsolidation in adult brain." *PLoS One* 3(10): e3540.

Kjelstrup, K. G., F. A. Tuvnes, H. A. Steffenach, R. Murison, E. I. Moser and M. B. Moser (2002). "Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10825-10830.

Klamer, G., E. Song, K. H. Ko, T. A. O'Brien and A. Dolnikov (2010). "Using small molecule GSK3 β inhibitors to treat inflammation." *Curr Med Chem* 17(26): 2873-2881.

Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8455-8459.

Klur, S., C. Muller, A. Pereira de Vasconcelos, T. Ballard, J. Lopez, R. Galani, U. Certa and J. C. Cassel (2009). "Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation." *Hippocampus* 19(9): 800-816.

Kodama, M., T. Fujioka and R. S. Duman (2004). "Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat." *Biol Psychiatry* 56(8): 570-580.

Koehl, M., P. Meerlo, D. Gonzales, A. Rontal, F. W. Turek and D. N. Abrous (2008). "Exercise-induced promotion of hippocampal cell proliferation requires beta-endorphin." *FASEB J* 22(7): 2253-2262.

Kondratiuk, I., H. Devijver, B. Lechat, F. Van Leuven, L. Kaczmarek and R. K. Filipkowski (2013). "Glycogen synthase kinase-3 β affects size of dentate gyrus and species-typical behavioral tasks in transgenic and knockout mice." *Behav Brain Res* 248: 46-50.

Koolhaas, J. M., A. Bartolomucci, B. Buwalda, S. F. de Boer, G. Flugge, S. M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Wöhr and E. Fuchs (2011). "Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept." *Neurosci Biobehav Rev* 35(5): 1291-1301.

Korosi, A., E. F. Naninck, C. A. Oomen, M. Schouten, H. Krugers, C. Fitzsimons and P. J. Lucassen (2012). "Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior." *Behav Brain Res* 227(2): 400-409.

Kozlovsky, N., R. H. Belmaker and G. Agam (2002). "GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia." *Eur Neuropsychopharmacol* 12(1): 13-25.

Krishnan, R. (2014). "Unipolar depression in adults: Epidemiology, pathogenesis, and neurobiology." *UpToDate*.

Kronenberg, G., K. Reuter, B. Steiner, M. D. Brandt, S. Jessberger, M. Yamaguchi and G. Kempermann (2003). "Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli." *J Comp Neurol* 467(4): 455-463.

Kuhn, H. G., M. Biebl, D. Wilhelm, M. Li, R. M. Friedlander and J. Winkler (2005). "Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis." *Eur J Neurosci* 22(8): 1907-1915.

Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson and F. H. Gage (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." *J Neurosci* 16(6): 2027-2033.

Kusserow, H., B. Davies, H. Hortnagl, I. Voigt, T. Stroh, B. Bert, D. R. Deng, H. Fink, R. W. Veh and F. Theuring (2004). "Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors." *Brain Res Mol Brain Res* 129(1-2): 104-116.

Lee, J. L., A. L. Milton and B. J. Everitt (2006). "Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation." *J Neurosci* 26(39): 10051-10056.

Lee, K. J., S. J. Kim, S. W. Kim, S. H. Choi, Y. C. Shin, S. H. Park, B. H. Moon, E. Cho, M. S. Lee, S. H. Choi, B. G. Chun and K. H. Shin (2006). "Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus." *Exp Mol Med* 38(1): 44-54.

Lee, S., W. K. Yang, J. H. Song, Y. M. Ra, J. H. Jeong, W. Choe, I. Kang, S. S. Kim and J. Ha (2013). "Anti-obesity effects of 3-hydroxychromone derivative, a novel small-molecule inhibitor of glycogen synthase kinase-3." *Biochem Pharmacol* 85(7): 965-976.

Lee, T., T. Jarome, S. J. Li, J. J. Kim and F. J. Helmstetter (2009). "Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study." *Neuroreport* 20(17): 1554-1558.

Leger, M., A. Quiedeville, V. Bouet, B. Haelewyn, M. Boulouard, P. Schumann-Bard and T. Freret (2013). "Object recognition test in mice." *Nat Protoc* 8(12): 2531-2537.

Lenox, R. H. and L. Wang (2003). "Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks." *Mol Psychiatry* 8(2): 135-144.

Leost, M., C. Schultz, A. Link, Y. Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, C. Kunick and L. Meijer (2000). "Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25." *Eur J Biochem* 267(19): 5983-5994.

Lesort, M., R. S. Jope and G. V. Johnson (1999). "Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 β and Fyn tyrosine kinase." *J Neurochem* 72(2): 576-584.

Leuner, B., E. R. Glasper and E. Gould (2009). "Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive." *J Comp Neurol* 517(2): 123-133.

Leuner, B., E. Gould and T. J. Shors (2006). "Is there a link between adult neurogenesis and learning?" *Hippocampus* 16(3): 216-224.

Li, L., H. Yuan, C. D. Weaver, J. Mao, G. H. Farr, 3rd, D. J. Sussman, J. Jonkers, D. Kimelman and D. Wu (1999). "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1." *EMBO J* 18(15): 4233-4240.

Li, X., G. N. Bijur and R. S. Jope (2002). "Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection." *Bipolar Disord* 4(2): 137-144.

Li, X., M. A. Frye and R. C. Shelton (2012). "Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development." *Neuropsychopharmacology* 37(1): 77-101.

Li, X. and R. S. Jope (2010). "Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation?" *Neuropsychopharmacology* 35(11): 2143-2154.

Li, X., K. M. Rosborough, A. B. Friedman, W. Zhu and K. A. Roth (2007). "Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics." *Int J Neuropsychopharmacol* 10(1): 7-19.

Li, X., W. Zhu, M. S. Roh, A. B. Friedman, K. Rosborough and R. S. Jope (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain." *Neuropsychopharmacology* 29(8): 1426-1431.

Li, Y., X. Zheng, J. Liang and Y. Peng (2010). "Coexistence of anhedonia and anxiety-independent increased novelty-seeking behavior in the chronic mild stress model of depression." *Behav Processes* 83(3): 331-339.

Liao, W. W., S. Y. Tsai, C. C. Liao, K. B. Chen, G. C. Yeh, J. Y. Chen and Y. R. Wen (2014). "Coadministration of glycogen-synthase kinase 3 inhibitor with morphine attenuates chronic morphine-induced analgesic tolerance and withdrawal syndrome." *J Chin Med Assoc* 77(1): 31-37.

Lie, D. C., S. A. Colamarino, H. J. Song, L. Desire, H. Mira, A. Consiglio, E. S. Lein, S. Jessberger, H. Lansford, A. R. Dearie and F. H. Gage (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." *Nature* 437(7063): 1370-1375.

Lie, D. C., G. Dziewczapolski, A. R. Willhoite, B. K. Kaspar, C. W. Shults and F. H. Gage (2002). "The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential." *J Neurosci* 22(15): 6639-6649.

Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180-185.

Lohi, H., L. Ianzano, X. C. Zhao, E. M. Chan, J. Turnbull, S. W. Scherer, C. A. Ackerley and B. A. Minassian (2005). "Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy." *Hum Mol Genet* 14(18): 2727-2736.

Lovestone, S., R. Killick, M. Di Forti and R. Murray (2007). "Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder." *Trends Neurosci* 30(4): 142-149.

Lucassen, P. J., J. Pruessner, N. Sousa, O. F. Almeida, A. M. Van Dam, G. Rajkowska, D. F. Swaab and B. Czeh (2014). "Neuropathology of stress." *Acta Neuropathol* 127(1): 109-135.

Lucassen, P. J., M. W. Stumpel, Q. Wang and E. Aronica (2010). "Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients." *Neuropharmacology* 58(6): 940-949.

Lupien, S. J., A. Evans, C. Lord, J. Miles, M. Pruessner, B. Pike and J. C. Pruessner (2007). "Hippocampal volume is as variable in young as in older adults: implications for the notion of hippocampal atrophy in humans." *Neuroimage* 34(2): 479-485.

Llorens-Martin, M., G. S. Tejeda and J. L. Trejo (2010). "Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis." *PLoS One* 5(8): e12188.

Llorens-Martin, M., G. S. Tejeda and J. L. Trejo (2011). "Antidepressant and proneurogenic influence of environmental enrichment in mice: protective effects vs recovery." *Neuropsychopharmacology* 36(12): 2460-2468.

Llorens-Martin, M., I. Torres-Aleman and J. L. Trejo (2006). "Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons." *Hippocampus* 16(5): 480-490.

Llorens-Martin, M., I. Torres-Aleman and J. L. Trejo (2010). "Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour." *Mol Cell Neurosci* 44(2): 109-117.

Llorens-Martin, M. and J. L. Trejo (2011). "Mifepristone prevents stress-induced apoptosis in newborn neurons and increases AMPA receptor expression in the dentate gyrus of C57/BL6 mice." *PLoS One* 6(11): e28376.

Llorens-Martin, M. and J. L. Trejo (2011). "Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects." *Front Neurosci* 5: 76.

Llorens-Martin, M. V., N. Rueda, C. Martinez-Cue, I. Torres-Aleman, J. Florez and J. L. Trejo (2007). "Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice." *Neuroscience* 147(3): 631-638.

- Llorens-Martin, M. V., N. Rueda, G. S. Tejeda, J. Florez, J. L. Trejo and C. Martinez-Cue (2010). "Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome." *Neuroscience* 171(4): 1228-1240.
- Ma, X. C., Y. H. Dang, M. Jia, R. Ma, F. Wang, J. Wu, C. G. Gao and K. Hashimoto (2013). "Long-lasting antidepressant action of ketamine, but not glycogen synthase kinase-3 inhibitor SB216763, in the chronic mild stress model of mice." *PLoS One* 8(2): e56053.
- Ma, Y. C., M. R. Song, J. P. Park, H. Y. Henry Ho, L. Hu, M. V. Kurtev, J. Zieg, Q. Ma, S. L. Pfaff and M. E. Greenberg (2008). "Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2." *Neuron* 58(1): 65-77.
- Mai, L., R. S. Jope and X. Li (2002). "BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents." *J Neurochem* 82(1): 75-83.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(24): 9104-9110.
- Malhi, G. S., M. Tanious, P. Das, C. M. Coulston and M. Berk (2013). "Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. Current understanding." *CNS Drugs* 27(2): 135-153.
- Manev, H., T. Uz, N. R. Smalheiser and R. Manev (2001). "Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro." *Eur J Pharmacol* 411(1-2): 67-70.
- Mann, J. J., K. M. Malone, J. A. Sweeney, R. P. Brown, M. Linnoila, B. Stanley and M. Stanley (1996). "Attempted suicide characteristics and cerebrospinal fluid amine metabolites in depressed inpatients." *Neuropsychopharmacology* 15(6): 576-586.
- Marcussen, A. B., P. Flagstad, P. E. Kristjansen, F. F. Johansen and U. Englund (2008). "Increase in neurogenesis and behavioural benefit after chronic fluoxetine treatment in Wistar rats." *Acta Neurol Scand* 117(2): 94-100.
- Markakis, E. A. and F. H. Gage (1999). "Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles." *J Comp Neurol* 406(4): 449-460.
- Markakis, E. A., T. D. Palmer, L. Randolph-Moore, P. Rakic and F. H. Gage (2004). "Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells." *J Neurosci* 24(12): 2886-2897.
- Martin, M., K. Rehani, R. S. Jope and S. M. Michalek (2005). "Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3." *Nat Immunol* 6(8): 777-784.
- Martinez, A., M. Alonso, A. Castro, C. Perez and F. J. Moreno (2002). "First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease." *J Med Chem* 45(6): 1292-1299.
- Martins-de-Souza, D., P. C. Guest, L. W. Harris, N. Vanattou-Saifoudine, M. J. Webster, H. Rahmoune and S. Bahn (2012). "Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients." *Transl Psychiatry* 2: e87.

Mateus-Pinheiro, A., L. Pinto, J. M. Bessa, M. Morais, N. D. Alves, S. Monteiro, P. Patricio, O. F. Almeida and N. Sousa (2013). "Sustained remission from depressive-like behavior depends on hippocampal neurogenesis." *Transl Psychiatry* 3: e210.

Mathiasen, J. R. and A. DiCamillo (2010). "Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function." *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5: Unit 5 59.

Mayer, J. L., L. Klumpers, S. Maslam, E. R. de Kloet, M. Joels and P. J. Lucassen (2006). "Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis." *J Neuroendocrinol* 18(8): 629-631.

Mazzardo-Martins, L., D. F. Martins, J. Stramosk, F. J. Cidral-Filho and A. R. Santos (2012). "Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action." *Neuroscience* 226: 411-420.

McGaugh, J. L., L. Cahill and B. Roozendaal (1996). "Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13508-13514.

McNeill, H. and J. R. Woodgett (2010). "When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(6): 404-413.

McHugh, S. B., R. M. Deacon, J. N. Rawlins and D. M. Bannerman (2004). "Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety." *Behav Neurosci* 118(1): 63-78.

McHugh, S. B., M. Fillenz, J. P. Lowry, J. N. Rawlins and D. M. Bannerman (2011). "Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety." *Eur J Neurosci* 33(2): 322-337.

Meshi, D., M. R. Drew, M. Saxe, M. S. Ansorge, D. David, L. Santarelli, C. Malapani, H. Moore and R. Hen (2006). "Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment." *Nat Neurosci* 9(6): 729-731.

Mineur, Y. S., C. Belzung and W. E. Crusio (2006). "Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice." *Behav Brain Res* 175(1): 43-50.

Mineur, Y. S., D. J. Prasol, C. Belzung and W. E. Crusio (2003). "Agonistic behavior and unpredictable chronic mild stress in mice." *Behav Genet* 33(5): 513-519.

Mirescu, C. and E. Gould (2006). "Stress and adult neurogenesis." *Hippocampus* 16(3): 233-238.

Monteiro, B. M., F. A. Moreira, A. R. Massensini, M. F. Moraes and G. S. Pereira (2013). "Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice." *Hippocampus*.

Montero-Pedrazuela, A., C. Venero, R. Lavado-Autric, I. Fernandez-Lamo, J. M. Garcia-Verdugo, J. Bernal and A. Guadano-Ferraz (2006). "Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior." *Mol Psychiatry* 11(4): 361-371.

Morales-Garcia, J. A., R. Luna-Medina, S. Alonso-Gil, M. Sanz-Sancristobal, V. Palomo, C. Gil, A. Santos, A. Martinez and A. Perez-Castillo (2012). "Glycogen synthase kinase 3 inhibition

promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo." *ACS Chem Neurosci* 3(11): 963-971.

Morales-Garcia, J. A., V. Palomo, M. Redondo, S. Alonso-Gil, C. Gil, A. Martinez and A. Perez-Castillo (2014). "Crosstalk between Phosphodiesterase 7 and Glycogen Synthase Kinase-3: Two Relevant Therapeutic Targets for Neurological Disorders." *ACS Chem Neurosci*.

Morcuende, S., C. A. Gadd, M. Peters, A. Moss, E. A. Harris, A. Sheasby, A. S. Fisher, C. De Felipe, P. W. Mantyh, N. M. Rupniak, K. P. Giese and S. P. Hunt (2003). "Increased neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor in neurokinin-1 receptor gene knockout mice." *Eur J Neurosci* 18(7): 1828-1836.

Morilak, D. A. and A. Frazer (2004). "Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders." *Int J Neuropsychopharmacol* 7(2): 193-218.

Morley-Fletcher, S., J. Mairesse, A. Soumier, M. Banasr, F. Fagioli, C. Gabriel, E. Mocaer, A. Daszuta, B. McEwen, F. Nicoletti and S. Maccari (2011). "Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 217(3): 301-313.

Morris, R. G., J. Inglis, J. A. Ainge, H. J. Olverman, J. Tulloch, Y. Dudai and P. A. Kelly (2006). "Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval." *Neuron* 50(3): 479-489.

Mukai, F., K. Ishiguro, Y. Sano and S. C. Fujita (2002). "Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta." *J Neurochem* 81(5): 1073-1083.

Nollet, M., P. Gaillard, F. Minier, A. Tanti, C. Belzung and S. Leman (2011). "Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression." *Neuropharmacology* 61(1-2): 336-346.

Nollet, M., P. Gaillard, A. Tanti, V. Girault, C. Belzung and S. Leman (2012). "Neurogenesis-independent antidepressant-like effects on behavior and stress axis response of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression." *Neuropsychopharmacology* 37(10): 2210-2221.

Nollet, M., A. M. Le Guisquet and C. Belzung (2013). "Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice." *Curr Protoc Pharmacol Chapter 5: Unit 5* 65.

Nyffeler, M., B. K. Yee, J. Feldon and I. Knuesel (2010). "Abnormal differentiation of newborn granule cells in age-related working memory impairments." *Neurobiol Aging* 31(11): 1956-1974.

O'Brien, W. T., A. D. Harper, F. Jove, J. R. Woodgett, S. Maretto, S. Piccolo and P. S. Klein (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium." *J Neurosci* 24(30): 6791-6798.

O'Leary, O. F., R. M. O'Connor and J. F. Cryan (2012). "Lithium-induced effects on adult hippocampal neurogenesis are topographically segregated along the dorso-ventral axis of stressed mice." *Neuropharmacology* 62(1): 247-255.

Oh, D. H., Y. C. Park and S. H. Kim (2010). "Increased glycogen synthase kinase-3beta mRNA level in the hippocampus of patients with major depression: a study using the stanley neuropathology consortium integrative database." *Psychiatry Investig* 7(3): 202-207.

Oh, D. H., H. Son, S. Hwang and S. H. Kim (2012). "Neuropathological abnormalities of astrocytes, GABAergic neurons, and pyramidal neurons in the dorsolateral prefrontal cortices of patients with major depressive disorder." *Eur Neuropsychopharmacol* 22(5): 330-338.

Omata, N., C. T. Chiu, P. R. Moya, Y. Leng, Z. Wang, J. G. Hunsberger, P. Leeds and D. M. Chuang (2011). "Lentivirally mediated GSK-3 β silencing in the hippocampal dentate gyrus induces antidepressant-like effects in stressed mice." *Int J Neuropsychopharmacol* 14(5): 711-717.

OMS (2012). "La depresión." Nota descriptiva N°369.

Oomen, C. A., C. E. Girardi, R. Cahyadi, E. C. Verbeek, H. Krugers, M. Joels and P. J. Lucassen (2009). "Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats." *PLoS One* 4(1): e3675.

Oomen, C. A., H. Soeters, N. Audureau, L. Vermunt, F. N. van Hasselt, E. M. Manders, M. Joels, P. J. Lucassen and H. Krugers (2010). "Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood." *J Neurosci* 30(19): 6635-6645.

Padín, J., M. Lozano and J. Sabán Ruiz (2001). "Depresión(I)." *El médico*.

Palmer, T. D., E. A. Markakis, A. R. Willhoite, F. Safar and F. H. Gage (1999). "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS." *J Neurosci* 19(19): 8487-8497.

Palmer, T. D., J. Ray and F. H. Gage (1995). "FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain." *Mol Cell Neurosci* 6(5): 474-486.

Palmer, T. D., A. R. Willhoite and F. H. Gage (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." *J Comp Neurol* 425(4): 479-494.

Pandey, G. N., Y. Dwivedi, H. S. Rizavi, T. Teppen, G. L. Gaszner, R. C. Roberts and R. R. Conley (2009). "GSK-3 β gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide." *Neurochem Res* 34(2): 274-285.

Papp, M., P. Willner and R. Muscat (1991). "An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress." *Psychopharmacology (Berl)* 104(2): 255-259.

Pardridge, W. M. (2009). "Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier." *Alzheimers Dement* 5(5): 427-432.

Parker, K. J., A. F. Schatzberg and D. M. Lyons (2003). "Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression." *Horm Behav* 43(1): 60-66.

Parks, C. L., P. S. Robinson, E. Sibille, T. Shenk and M. Toth (1998). "Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10734-10739.

Patel, A. (2013). "Review: the role of inflammation in depression." *Psychiatr Danub* 25 Suppl 2: S216-223.

Paxinos, G. F., K. (2012). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier.

Peeters, B. W. and C. L. Broekkamp (1994). "Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression." *J Steroid Biochem Mol Biol* 49(4-6): 417-427.

Peineau, S., C. Taghibiglou, C. Bradley, T. P. Wong, L. Liu, J. Lu, E. Lo, D. Wu, E. Saule, T. Bouschet, P. Matthews, J. T. Isaac, Z. A. Bortolotto, Y. T. Wang and G. L. Collingridge (2007). "LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta." *Neuron* 53(5): 703-717.

Pentkowski, N. S., D. C. Blanchard, C. Lever, Y. Litvin and R. J. Blanchard (2006). "Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats." *Eur J Neurosci* 23(8): 2185-2196.

Pereda-Perez, I., N. Popovic, B. B. Otalora, M. Popovic, J. A. Madrid, M. A. Rol and C. Venero (2013). "Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment." *Neurobiol Learn Mem* 106: 31-39.

Perez-Domper, P., S. Gradari and J. L. Trejo (2013). "The growth factors cascade and the dendrito-/synapto-genesis versus cell survival in adult hippocampal neurogenesis: the chicken or the egg." *Ageing Res Rev* 12(3): 777-785.

Petit-Demouliere, B., F. Chenu and M. Bourin (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." *Psychopharmacology (Berl)* 177(3): 245-255.

Petrik, D., D. C. Lagace and A. J. Eisch (2012). "The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building?" *Neuropharmacology* 62(1): 21-34.

Pezawas, L., J. Angst and S. Kasper (2005). "Recurrent brief depression revisited." *Int Rev Psychiatry* 17(1): 63-70.

Phiel, C. J., F. Zhang, E. Y. Huang, M. G. Guenther, M. A. Lazar and P. S. Klein (2001). "Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen." *J Biol Chem* 276(39): 36734-36741.

Picton, C., J. Woodgett, B. Hemmings and P. Cohen (1982). "Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Phosphorylation of site 5 by glycogen synthase kinase-5 (casein kinase-II) is a prerequisite for phosphorylation of sites 3 by glycogen synthase kinase-3." *FEBS Lett* 150(1): 191-196.

Plotsky, P. M., M. J. Owens and C. B. Nemeroff (1998). "Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis." *Psychiatr Clin North Am* 21(2): 293-307.

Polter, A., E. Beurel, S. Yang, R. Garner, L. Song, C. A. Miller, J. D. Sweatt, L. McMahon, A. A. Bartolucci, X. Li and R. S. Jope (2010). "Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances." *Neuropsychopharmacology* 35(8): 1761-1774.

Polter, A. M. and X. Li (2011). "Glycogen Synthase Kinase-3 is an Intermediate Modulator of Serotonin Neurotransmission." *Front Mol Neurosci* 4: 31.

Poppenk, J., H. R. Evensmoen, M. Moscovitch and L. Nadel (2013). "Long-axis specialization of the human hippocampus." *Trends Cogn Sci* 17(5): 230-240.

Porsolt, R. D., A. Bertin and M. Jalfre (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229(2): 327-336.

Porsolt, R. D., M. Le Pichon and M. Jalfre (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." *Nature* 266(5604): 730-732.

Pothuizen, H. H., W. N. Zhang, A. L. Jongen-Relo, J. Feldon and B. K. Yee (2004). "Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory." *Eur J Neurosci* 19(3): 705-712.

Pruessner, J. C., K. Dedovic, M. Pruessner, C. Lord, C. Buss, L. Collins, A. Dagher and S. J. Lupien (2010). "Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations - 2008 Curt Richter Award Winner." *Psychoneuroendocrinology* 35(1): 179-191.

Rainer, Q., H. T. Nguyen, G. Quesseveur, A. M. Gardier, D. J. David and B. P. Guiard (2012). "Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration." *Mol Pharmacol* 81(2): 106-112.

Ramón y Cajal, S. (1928). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System.*, Oxford University Press.

Revest, J. M., D. Dupret, M. Koehl, C. Funk-Reiter, N. Grosjean, P. V. Piazza and D. N. Abrous (2009). "Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors." *Mol Psychiatry* 14(10): 959-967.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255(5052): 1707-1710.

Riad, M., S. Garcia, K. C. Watkins, N. Jodoin, E. Doucet, X. Langlois, S. el Mestikawy, M. Hamon and L. Descarries (2000). "Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain." *J Comp Neurol* 417(2): 181-194.

Ricken, R., M. Adli, C. Lange, E. Krusche, T. J. Stamm, S. Gaus, S. Koehler, S. Nase, T. Bschor, C. Richter, B. Steinacher, A. Heinz, M. A. Rapp, S. Borgwardt, R. Hellweg and U. E. Lang (2013). "Brain-derived neurotrophic factor serum concentrations in acute depressive patients increase during lithium augmentation of antidepressants." *J Clin Psychopharmacol* 33(6): 806-809.

Rosa, A. O., M. P. Kaster, R. W. Binfare, S. Morales, E. Martin-Aparicio, M. L. Navarro-Rico, A. Martinez, M. Medina, A. G. Garcia, M. G. Lopez and A. L. Rodrigues (2008). "Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(6): 1549-1556.

Royet, J. P. (1991). "Stereology: a method for analyzing images." *Prog Neurobiol* 37(5): 433-474.

Ryves, W. J. and A. J. Harwood (2001). "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium." *Biochem Biophys Res Commun* 280(3): 720-725.

Sallee, F. R., L. Nesbitt, D. Dougherty, R. Hilal, V. S. Nandagopal and G. Sethuraman (1995). "Lymphocyte glucocorticoid receptor: predictor of sertraline response in adolescent major depressive disorder (MDD)." *Psychopharmacol Bull* 31(2): 339-345.

Sanacora, G., G. F. Mason, D. L. Rothman, K. L. Behar, F. Hyder, O. A. Petroff, R. M. Berman, D. S. Charney and J. H. Krystal (1999). "Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in

depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy." *Arch Gen Psychiatry* 56(11): 1043-1047.

Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* 301(5634): 805-809.

Saus, E., V. Soria, G. Escaramis, J. M. Crespo, J. Valero, A. Gutierrez-Zotes, L. Martorell, E. Vilella, J. M. Menchon, X. Estivill, M. Gratacos and M. Urretavizcaya (2010). "A haplotype of glycogen synthase kinase 3beta is associated with early onset of unipolar major depression." *Genes Brain Behav* 9(7): 799-807.

Sayas, C. L., A. Ariaens, B. Ponsioen and W. H. Moolenaar (2006). "GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction." *Mol Biol Cell* 17(4): 1834-1844.

Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20(1): 11-21.

Schatzberg, A. and S. Roose (2006). "A double-blind, placebo-controlled study of venlafaxine and fluoxetine in geriatric outpatients with major depression." *Am J Geriatr Psychiatry* 14(4): 361-370.

Schermuly, I., D. Wolf, K. Lieb, P. Stoeter and A. Fellgiebel (2011). "State dependent posterior hippocampal volume increases in patients with major depressive disorder." *J Affect Disord* 135(1-3): 405-409.

Schlaepfer, T. E. and B. H. Bewernick (2014). "Neuromodulation for treatment resistant depression: state of the art and recommendations for clinical and scientific conduct." *Brain Topogr* 27(1): 12-19.

Schweizer, M. C., M. S. Henniger and I. Sillaber (2009). "Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity." *PLoS One* 4(1): e4326.

Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen and A. Alvarez-Buylla (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." *J Neurosci* 21(18): 7153-7160.

Shors, T. J., D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy and E. Gould (2002). "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning." *Hippocampus* 12(5): 578-584.

Silva, R., A. R. Mesquita, J. Bessa, J. C. Sousa, I. Sotiropoulos, P. Leao, O. F. Almeida and N. Sousa (2008). "Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta." *Neuroscience* 152(3): 656-669.

Simón Sanz, D. (2009). Estudio del papel de la proteína glucógeno sintasa quinasa (GSK3) en procesos de neurodegeneración. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

Sintoni, S., E. Kurtys, M. Scandaglia, A. Contestabile and B. Monti (2013). "Chronic valproic acid administration impairs contextual memory and dysregulates hippocampal GSK-3beta in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 106: 8-15.

Sirerol-Piquer, M., P. Gomez-Ramos, F. Hernandez, M. Perez, M. A. Moran, A. Fuster-Matanzo, J. J. Lucas, J. Avila and J. M. Garcia-Verdugo (2011). "GSK3beta overexpression

induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus." *Hippocampus* 21(8): 910-922.

Slattery, D. A. and J. F. Cryan (2012). "Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents." *Nat Protoc* 7(6): 1009-1014.

Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel and H. A. Cameron (2011). "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." *Nature* 476(7361): 458-461.

Song, H., C. F. Stevens and F. H. Gage (2002). "Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells." *Nature* 417(6884): 39-44.

Sousa, N., N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. Almeida and M. M. Paula-Barbosa (2000). "Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement." *Neuroscience* 97(2): 253-266.

Stambolic, V., L. Ruel and J. R. Woodgett (1996). "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells." *Curr Biol* 6(12): 1664-1668.

Stambolic, V. and J. R. Woodgett (1994). "Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation." *Biochem J* 303 (Pt 3): 701-704.

Starkman, M. N., S. S. Gebarski, S. Berent and D. E. Schteingart (1992). "Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome." *Biol Psychiatry* 32(9): 756-765.

Steiner, B., G. Kronenberg, S. Jessberger, M. D. Brandt, K. Reuter and G. Kempermann (2004). "Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice." *Glia* 46(1): 41-52.

Stockmeier, C. A., G. J. Mahajan, L. C. Konick, J. C. Overholser, G. J. Jurjus, H. Y. Meltzer, H. B. Uylings, L. Friedman and G. Rajkowska (2004). "Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression." *Biol Psychiatry* 56(9): 640-650.

Suhonen, J. O., D. A. Peterson, J. Ray and F. H. Gage (1996). "Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo." *Nature* 383(6601): 624-627.

Sun, H. and Q. M. Chen (2008). "Inhibitors of GSK-3 prevent corticosterone from inducing COX-1 expression in cardiomyocytes." *Cardiovasc Toxicol* 8(2): 93-100.

Sun, Y., N. H. Kim, H. Yang, S. H. Kim and S. O. Huh (2011). "Lysophosphatidic acid induces neurite retraction in differentiated neuroblastoma cells via GSK-3beta activation." *Mol Cells* 31(5): 483-489.

Surget, A., M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, R. Hen and C. Belzung (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biol Psychiatry* 64(4): 293-301.

Surget, A., A. Tanti, E. D. Leonardo, A. Laugeray, Q. Rainer, C. Touma, R. Palme, G. Griebel, Y. Ibarguen-Vargas, R. Hen and C. Belzung (2011). "Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation." *Mol Psychiatry* 16(12): 1177-1188.

Surget, A., Y. Wang, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, N. Edgar, G. Griebel, C. Belzung and E. Sibille (2009). "Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in

a rodent model of depression and of antidepressant reversal." *Neuropsychopharmacology* 34(6): 1363-1380.

Suri, D., V. Veenit, A. Sarkar, D. Thiagarajan, A. Kumar, E. J. Nestler, S. Galande and V. A. Vaidya (2013). "Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition." *Biol Psychiatry* 73(7): 658-666.

Sutherland, C., I. A. Leighton and P. Cohen (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." *Biochem J* 296 (Pt 1): 15-19.

Takashima, A. (2012). "GSK-3beta and memory formation." *Front Mol Neurosci* 5: 47.

Tanti, A. and C. Belzung (2013). "Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific?" *Neuroscience* 252: 234-252.

Tanti, A., Q. Rainer, F. Minier, A. Surget and C. Belzung (2012). "Differential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus." *Neuropharmacology* 63(3): 374-384.

Tanti, A., W. P. Westphal, V. Girault, B. Brizard, S. Devers, A. M. Leguisquet, A. Surget and C. Belzung (2013). "Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis." *Hippocampus* 23(9): 797-811.

Thomas, R. M., G. Hotsenpiller and D. A. Peterson (2007). "Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation." *J Neurosci* 27(11): 2734-2743.

Thomas, R. M., J. H. Urban and D. A. Peterson (2006). "Acute exposure to predator odor elicits a robust increase in corticosterone and a decrease in activity without altering proliferation in the adult rat hippocampus." *Exp Neurol* 201(2): 308-315.

Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, B. Deng, C. D. Wood, A. Aronshtam, J. L. Clements, G. Sabio, R. J. Davis, D. E. Matthews, B. Doble and M. Rincon (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." *Science* 320(5876): 667-670.

Tollefson, G. D., J. C. Bosomworth, J. H. Heiligenstein, J. H. Potvin and S. Holman (1995). "A double-blind, placebo-controlled clinical trial of fluoxetine in geriatric patients with major depression. The Fluoxetine Collaborative Study Group." *Int Psychogeriatr* 7(1): 89-104.

Touyarot, K., D. Bonhomme, P. Roux, S. Alfons, P. Lafenetre, E. Richard, P. Higuieret and V. Pallet (2013). "A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I." *PLoS One* 8(8): e72101.

Trivedi, M. A. and G. D. Coover (2004). "Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze." *Neurobiol Learn Mem* 81(3): 172-184.

Vademecum (2013). Vademecum Internacional. Madrid, UBM Medica Spain, SA.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." *Nat Neurosci* 2(3): 266-270.

van Praag, H., A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer and F. H. Gage (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." *Nature* 415(6875): 1030-1034.

van Praag, H., T. Shubert, C. Zhao and F. H. Gage (2005). "Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice." *J Neurosci* 25(38): 8680-8685.

Varela-Nallar, L. and N. C. Inestrosa (2013). "Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis." *Front Cell Neurosci* 7: 100.

Vargha-Khadem, F., D. G. Gadian, K. E. Watkins, A. Connelly, W. Van Paesschen and M. Mishkin (1997). "Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory." *Science* 277(5324): 376-380.

Wang, F. S., J. Y. Ko, L. H. Weng, D. W. Yeh, H. J. Ke and S. L. Wu (2009). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β attenuates glucocorticoid-induced bone loss." *Life Sci* 85(19-20): 685-692.

Wang, J. W., D. J. David, J. E. Monckton, F. Battaglia and R. Hen (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." *J Neurosci* 28(6): 1374-1384.

Wang, Q., M. Joels, D. F. Swaab and P. J. Lucassen (2012). "Hippocampal GR expression is increased in elderly depressed females." *Neuropharmacology* 62(1): 527-533.

Wang, Q., J. Van Heerikhuize, E. Aronica, M. Kawata, L. Seress, M. Joels, D. F. Swaab and P. J. Lucassen (2013). "Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age." *Neurobiol Aging* 34(6): 1662-1673.

Wang, Q., E. W. Verweij, H. J. Krugers, M. Joels, D. F. Swaab and P. J. Lucassen (2013). "Distribution of the glucocorticoid receptor in the human amygdala; changes in mood disorder patients." *Brain Struct Funct*.

Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheatley, A. C. Peterson and B. A. Reynolds (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." *J Neurosci* 16(23): 7599-7609.

Werstuck, G. H., A. J. Kim, T. Brenstrum, S. A. Ohnmacht, E. Panna and A. Capretta (2004). "Examining the correlations between GSK-3 inhibitory properties and anti-convulsant efficacy of valproate and valproate-related compounds." *Bioorg Med Chem Lett* 14(22): 5465-5467.

West, M. J. (1993). "New stereological methods for counting neurons." *Neurobiol Aging* 14(4): 275-285.

West, M. J., L. Slomianka and H. J. Gundersen (1991). "Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator." *Anat Rec* 231(4): 482-497.

Wexler, E. M., D. H. Geschwind and T. D. Palmer (2008). "Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation." *Mol Psychiatry* 13(3): 285-292.

Wexler, E. M., A. Paucer, H. I. Kornblum, T. D. Palmer and D. H. Geschwind (2009). "Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency." *Stem Cells* 27(5): 1130-1141.

Willner, P. (2005). "Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS." *Neuropsychobiology* 52(2): 90-110.

Willner, P., J. L. Moreau, C. K. Nielsen, M. Papp and A. Sluzewska (1996). "Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight." *Physiol Behav* 60(1): 129-134.

Willner, P., R. Muscat and M. Papp (1992). "Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression." *Neurosci Biobehav Rev* 16(4): 525-534.

Wood-Kaczmar, A., M. Kraus, K. Ishiguro, K. L. Philpott and P. R. Gordon-Weeks (2009). "An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3 β is targeted to growing neurites and growth cones." *Mol Cell Neurosci* 42(3): 184-194.

Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." *EMBO J* 9(8): 2431-2438.

Yost, C., M. Torres, J. R. Miller, E. Huang, D. Kimelman and R. T. Moon (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3." *Genes Dev* 10(12): 1443-1454.

Yuskaitis, C. J. and R. S. Jope (2009). "Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity." *Cell Signal* 21(2): 264-273.

Zamek-Gliszczyński, M. J., T. L. Abraham, J. J. Alberts, P. Kulanthaivel, K. A. Jackson, K. H. Chow, D. J. McCann, H. Hu, S. Anderson, N. A. Furr, R. J. Barbuch and K. C. Cassidy (2013). "Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of the glycogen synthase kinase-3 inhibitor LY2090314 in rats, dogs, and humans: a case study in rapid clearance by extensive metabolism with low circulating metabolite exposure." *Drug Metab Dispos* 41(4): 714-726.

Zhang, C. L., Y. Zou, W. He, F. H. Gage and R. M. Evans (2008). "A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour." *Nature* 451(7181): 1004-1007.

Zhang, K., X. Song, Y. Xu, X. Li, P. Liu, N. Sun, X. Zhao, Z. Liu, Z. Xie and J. Peng (2013). "Continuous GSK-3 β overexpression in the hippocampal dentate gyrus induces prodepressant-like effects and increases sensitivity to chronic mild stress in mice." *J Affect Disord* 146(1): 45-52.

Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." *Cell* 132(4): 645-660.

Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers, Jr., G. L. Ming and F. H. Gage (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." *J Neurosci* 26(1): 3-11.

Zhou, F. Q. and W. D. Snider (2005). "Cell biology. GSK-3 β and microtubule assembly in axons." *Science* 308(5719): 211-214.

Zhou, W., L. Chen, J. Paul, S. Yang, F. Li, K. Sampson, J. R. Woodgett, J. M. Beaulieu, K. L. Gamble and X. Li (2012). "The effects of glycogen synthase kinase-3 β in serotonin neurons." *PLoS One* 7(8): e43262.

Zola-Morgan, S., L. R. Squire and S. J. Ramus (1994). "Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system." *Hippocampus* 4(4): 483-495.

Artículos publicados:

- Pérez-Domper P, Gradari S, Trejo JL. The growth factors cascade and the dendrito-/synapto-genesis versus cell survival in adult hippocampal neurogenesis: the chicken or the egg. **Ageing Res Rev.** 2013
- Gradari S^{*}, Pérez-Domper P^{*}, Butler RG, Martínez-Cué C, Polavieja GG, Trejo JL. Behavior acquisition and persistence abilities: Involvement of adult hippocampal neurogenesis. **Translational Psychiatry.** In review